

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra analytické chemie**

**Analýza chininu v nápojích fluorescenční spektrometrií**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:

Ivan Zvardoň

Studijní obor:

Chemie

Vedoucí práce:

doc. Ing. David Milde, Ph.D.

2023 Olomouc

## **PROHLÁŠENÍ**

Tímto prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracoval samostatně v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb. a pro její tvorbu využil pouze zdrojů citovaných v textu práce a uvedených v seznamu literatury.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

v Olomouci dne .....

podpis autora .....

## BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Ivan Zvardoň

Název práce: Analýza chininu v nápojích fluorescenční spektrometrií

Typ práce: bakalářská

Pracoviště: Katedra analytické chemie

Vedoucí práce: Ing. David Milde, Ph.D.

Rok odevzdání práce: 2023

### Anotace:

Spektrofluorimetrie je spektrální analytická metoda vykazující velmi dobré meze detekce a proto jí bylo v této práci využito pro stanovení chininu v nápojích. Byly prozkoumány dopady materiálu kyvet, pH vzorků a přítomnost filtrů na intenzitu registrovaného signálu, na základě čehož byly zvoleny optimální podmínky pro další měření. Byly proměřeny vzorky vybraných toniků a koncentrátu pro SodaStream, v nichž se fluorimetricky stanovoval obsah chininu emitujícího záření při 450 nm. Excitace probíhala při 350 nm, v plastové 1cm kyvetě, za nízké citlivosti přístroje a pH = 2,73. Mez detekce této metody byla  $1,05 \cdot 10^{-4} \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . U dvou vzorků z dvanácti nebylo za daných podmínek obsah látky možno stanovit. Dva vzorky překračovaly v České republice zákonem danou hranici pro obsah chininu v nealkoholických nápojích.

Klíčová slova: fluorescence, luminiscence, spektrofluorimetrie, tonik, chinin

Počet stran: 64

Počet příloh: 0

Jazyk: čeština

## BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and Surname: Ivan Zvardoň

Title: Analysis of quinine in beverages by fluorescence spectrometry

Type of thesis: bachelor's

Department: Department of Analytical Chemistry

Supervisor: Ing. David Milde, Ph.D.

The year of submission: 2023

Annotation:

Spectrofluorimetry is a spectral analytical method showing very good detection limits and was therefore used in this work for the determination of quinine in beverages. The effects of cuvette material, sample pH and the presence of filters on the intensity of the registered signal were investigated, based on which the optimum conditions for further measurements were selected. Samples of selected tonics and concentrate for SodaStream were examined for fluorimetric determination of the quinine emitting content at 450 nm. Excitation was carried out at 350 nm, in a plastic 1 cm cuvette, under low instrument sensitivity and pH = 2.73. The limit of detection of this method was  $1.05 \cdot 10^{-4}$  mg.l<sup>-1</sup>. For two samples out of twelve, the content of the substance could not be determined under the given conditions. Two samples exceeded the legal limit for quinine in soft drinks in the Czech Republic.

Keywords: fluorescence, luminescence, spectrofluorimetry, tonic, quinine

Number of pages: 64

Number of appendices: 0

Language: czech



## SEZNAM ZKRATEK

CITP	kapilární izotachoforéza (capillary isotachopheresis)
CT	přenos náboje (charge transfer)
DPV	diferenční pulzní voltametrie (differential pulse voltametry)
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority)
FA, FB	filtr A, filtr B
FF	přední strana (front face)
FIR	daleká infračervená (far-infrared)
GC	plynová chromatografie (gass chromatography)
HOMO	nejvyšší obsazený atomový orbital (highest occupied molecular orbital)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (International Union of Pure and Applied Chemistry)
LCAO	lineární kombinace atomových orbitalů (linear combination of atomic orbitals)
LED	světlo emitující dioda (light emitting diode)
LIF	laserem indukovaná fluorescence (laser induced fluorescence)
LOD	mez detekce (limit of detection)
LUMO	nejnižší obsazený atomový orbital (lowest unoccupied molecular orbital)
MIR	střední infračervená (mid-infrared)
MO	molekulový orbital (molecular orbital)
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
n	počet měření
NIR	blízká infračervená (near-infrared)
OD	optická hustota (optical density)
PMT	fotonásobič (photomultiplier tube)
RP-IPC	iontová párová chromatografie na reverzní fázi (reversed phase ion pair chromatography)
SWV	square wave voltametry
UV	ultrafialové (ultraviolet)
VIS	viditelné (visible)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
ZF	zónová fluidika

# OBSAH

1 ÚVOD.....	8
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1 ELEKTROMAGNETICKÉ ZÁŘENÍ.....	9
2.1.1 VLNOVÉ VLASTNOSTI.....	9
2.1.2 INTERAKCE ZÁŘENÍ S HMOTOU BEZ VÝMĚNY ENERGIE.....	10
2.1.3 INTERAKCE ZÁŘENÍ S HMOTOU ZA VÝMĚNY ENERGIE.....	11
2.1.3.1 LAMBERT-BEERŮV ZÁKON A ODCHYLKY OD NĚJ.....	11
2.1.3.2 TYPY PŘECHODŮ.....	14
2.1.3.2.1 BĚŽNÉ ELEKTRONOVÉ PŘECHODY.....	15
2.1.3.2.2 SPECIÁLNÍ ELEKTRONOVÉ PŘECHODY.....	16
2.1.3.2.3 ZAKÁZANÉ ELEKTRONOVÉ PŘECHODY.....	17
2.1.3.3 LUMINISCENCE.....	18
2.1.3.3.1 FLUORESCENCE.....	20
2.1.3.3.2 FOSFORESCENCE.....	22
2.1.3.3.3 RAMANŮV ROZPTYL.....	22
2.2 SPEKTROFLUORIMETRIE.....	24
2.2.1 ZDROJE ZÁŘENÍ.....	26
2.2.2 MONOCHROMÁTORY.....	27
2.2.3 KYVETY.....	29
2.2.4 DETEKTORY.....	29
2.2.5 ANALÝZA PEVNÝCH VZORKŮ.....	30
2.3 CHININ.....	32
2.3.1 CHEMICKO-FYZIKÁLNÍ SPECIFIKA.....	32
2.3.2 HISTORICKÝ KONTEXT.....	33
2.3.2.1 KOLONIÁLNÍ ÉRA.....	33
2.3.2.2 VÁLEČNÉ OBDOBÍ.....	34
2.3.2.3 TONIK.....	35
2.3.3 SYNTÉZA.....	35
2.3.4 CHININ A ZDRAVÍ.....	36
2.3.4.1 MALÁRIE.....	36
2.3.4.2 TOXICITA.....	38
2.3.4.3 LEGISLATIVA.....	39
2.3.5 VYBRANÉ PŘÍPADY STANOVENÍ CHININU.....	39
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	41
3.1 ANALYZOVANÉ VZORKY.....	41
3.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	41
3.3 INSTRUMENTACE A EXPERIMENTÁLNÍ PODMÍNKY.....	41
3.4 POSTUP MĚŘENÍ.....	43
3.4.1 STANOVENÍ OPTIMÁLNÍHO pH.....	43
3.4.2 PROMĚŘENÍ SPEKTER.....	44

3.4.3 STANOVENÍ OBSAHU CHININU VE VZORCÍCH.....	44
3.4.4 MEZ DETEKCE.....	45
3.5 ZPRACOVÁNÍ DAT.....	45
4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	47
4.1 VLIV pH.....	47
4.2 SPEKTRA.....	48
4.2.1 EXCITAČNÍ A EMISNÍ SPEKTRA.....	48
4.2.2 ABSORPČNÍ SPEKTRA.....	49
4.3 POROVNÁNÍ KYVET.....	51
4.4 VYBRANÉ VALIDAČNÍ PARAMETRY.....	52
4.4.1 ROZSAH KALIBRACE.....	52
4.4.2 MEZ DETEKCE.....	55
4.4.3 VÝTĚŽNOST.....	55
4.5 FLUORIMETRICKÁ ANALÝZA VZORKŮ.....	56
4.6 DISKUSE VÝSLEDKŮ.....	58
5 ZÁVĚR.....	59
CITOVANÁ LITERATURA.....	60

## 1 ÚVOD

Malárie, způsobovaná parazitickými zimničkami přenášených na člověka samičkami komárů, je závažné onemocnění, na nějž dlouho neexistoval účinný lék. Není proto překvapivé, že s objevem chinovníku, jehož aktivní alkaloid chinin nemoci zabraňoval, byl o jeho léčebný výtažek, tonikum, veliký zájem. S vynálezem koncentrovaných vod a jeho následné popularizaci J. Schweppem se chinin obsahující toniky začaly pro potěchu konzumovat širokou veřejností. Neboť je chinin velice hořká látka, byl, a ostatně stále je i dodnes, konzumován v kombinaci s alkoholem.

Přestože je látka účinná v boji proti malárii, je-li podávána ve větších množstvích, může způsobit řadu zdravotních obtíží, jež se označují názvem cinchonismus. Mimo příznaky, jakými jsou nevolnosti, průjemy, křeče či bolesti hlavy, které se dostávají při požití více než 4 g látky, jsou hlášeny případy, kdy dvojnásobná dávka u dospělých jedinců vedla k úmrtím. Konzumace chininu tedy není vhodná zejména pro těhotné ženy a děti.

Obsahy chininu v komerčně prodávaných potravinách jsou proto zákonně omezeny. Kupříkladu v Česku je jeho množství vyhláškou č. 447/2004 Sb. u většiny typů nápojů omezeno na  $75 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . S tím tedy vyvstává nutnost obsahy chininu ve vzorcích spolehlivě detekovat a pokud možno přesně stanovit jejich množství. Příkladem analytické metody pro toto vhodné, je fluorescenční spektrometrie.

Fluorescenční spektrometrie je nedestruktivní spektrální metoda založená na sledování intenzity emisního fluorescenčního záření vzorku po té, co byl ozářen elektromagnetickým zářením v oblasti UV nebo viditelné. Je to metoda schopná kvalitativní i kvantitativní analýzy s nízkou mezí detekce a užitečná je především při stanovování stopových množství.

Tato práce se věnuje stanovení chininu v nápojích metodou fluorescenční spektrometrie. Dále zkoumá důsledky změny pH a materiálu kyvety na intenzitu poskytovaného signálu a kalibrační rozsah, v němž je metoda použitelná, aby dala podklad k přípravě nové úlohy analytického cvičení pro vybrané studijní programy Univerzity Palackého v Olomouci.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 ELEKTROMAGNETICKÉ ZÁŘENÍ

Fotony jsou elementární částice o celočíselném spinu (bosony) s nulovou hmotností a nábojem pohybující se rychlostí světla. Obdobně jako u ostatních částic mikrosvěta, i fotony vykazují vlnově-korpuskulární dualismus, tedy vlastnost, díky níž je možné tyto částice současně chápat jak z hlediska jejich korpuskulárního (částicového) charakteru, tak i jako by se jednalo o vlny. Jestliže jsou pak fotony vyjádřeny skrze druhý pohled, tedy s pomocí vln, je u nich možno pozorovat sinusoidně oscilující dvojici na sebe kolmých polí – pole elektrického a pole magnetického, což podrobněji popisuje tzv. *Maxwellova teorie elektromagnetismu*. Odtud tedy plyne terminologie proudu těchto částic, a sice elektromagnetické záření, nebo též elektromagnetické vlnění či radiace. [1-6]

Ve většině případů, ostatně i dále v této práci, je, především u fotonů s kratší vlnovou délkou, uvažována hlavně jejich částicová podoba. U delších vlnových délek nebo v jejich větším množství pak převládá vlnový charakter. [3,5] Rovněž se práce zaměří především na elektrickou složku záření, neboť ta je zodpovědná za většinu dále probíraných jevů. [3]

#### 2.1.1 VLNOVÉ VLASTNOSTI

Elektromagnetické záření lze z hlediska vlnových vlastností popsat několika veličinami, z nichž první je *amplituda*  $A$ , výška sinusoidní křivky v jejím maximu. Míra, s jakou dochází k opětovnému návratu do tohoto bodu za jednotku času, se nazývá *frekvence*  $\nu$  a jde tedy o počet oscilací za tento čas. Je definována zdrojem a zůstává invariantní. [3] Nejběžnějšími jednotkami frekvence jsou reciproké sekundy ( $s^{-1}$ ) nebo hertze (Hz) znamenající počet cyklů za sekundu. [7] *Vlnová délka*  $\lambda$  zachycuje lineární vzdálenost mezi jakýmkoli po sobě následujícími ekvivalentními body následujících vln. Její jednotky se odvíjejí od této vzdálenosti; používány jsou IUPACem nepříliš upřednostňované angstromy ( $1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$ ), mikrony ( $1 \mu = 10^{-6} \text{ m}$ ), či nanometry ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ), atd. Převrácenou hodnotou vlnové délky je *vlnocet* nebo *vlnové číslo*  $\bar{\nu}$ , což je počet vln na délce jednoho centimetru, a proto jsou jeho jednotkou reciproké centimetry  $\text{cm}^{-1}$ . [1-6,8,9]

Rychlost šíření vlny vakuem  $c$  (v případě jakéhokoliv jiného prostředí by bylo třeba uvažovat i médium, jímž záření prostupuje a rychlost by byla zákonitě nižší) je rovno přibližně  $2,99792 \cdot 10^8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  a lze vyjádřit vztahem

$$c = \nu \cdot \lambda = \frac{v}{\nu} \quad (1)$$

Při studiu záření černého tělesa byla zjištěna závislost výše uvedených veličin na energii  $E$  (v joulech  $J$ , příp. v elektronvoltech  $eV = 1,602 \cdot 10^{-19} \text{ J}$ ), již záření disponuje a pomoci níž je možno jej kvantifikovat.

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} = h \cdot c \cdot \nu \quad (2)$$

Symbol  $h$  značí Planckovu konstantu, jež je rovna  $6,625 \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$ . Z této závislosti (2) je patrné, že se zvyšující se frekvencí stejně jako se zkracující se vlnovou délkou narůstá energie záření. [2-6,8-11]

Jestliže je energie záření vztažena k jednotce času, hovořívá se o zářivé síle nebo též intenzitě, avšak intenzita v sobě správně zahrnuje i úhel, pod nímž od zdroje záření v určitém směru proudí. [3,5] Pokud je tedy proud veškeré zářivé energie vztažen pouze na čas, měla by správně být řeč o *zářivém toku*  $\Phi$  (jednotkou watt  $W$ ), [2,3,5,10] ačkoliv v praxi jsou tyto pojmy často zaměňovány a chápány jako synonyma.

Elektromagnetické spektrum, které zahrnuje záření různé vlnové délky, lze podle vlnové délky (a veličin od ní se odvíjejících) dělit do několika oblastí (rádiová, mikrovlnná, infračervená, viditelná, ultrafialová, rentgenová, gamma), ačkoliv se jedná spíše o přibližné pojmy bez pevně daných rozhraní, kvůli čemuž se mohou v závislosti od použité literatury od sebe mírně lišit. [2-6,8,12] Pro svůj široký rozsah je uváděno v logaritmickém měřítku.

### 2.1.2 INTERAKCE ZÁŘENÍ S HMOTOU BEZ VÝMĚNY ENERGIE

Prvním typem interakcí, ke kterým může mezi zářením a hmotou dojít, jsou ty, při nichž nedochází k výměně energie. Příkladem několika z nich mohou být: lom a změna směřování záření na rozhraní dvojice fází o různé optické hustotě, stáčení roviny polarizovaného záření přítomností opticky aktivní látky v závislosti na použité vlnové

délce, disperze (rozklad), rozptyl, nebo difrakce (ohyb) jeho paprsků, apod. [2,3,5,6,10,13,14]

Ačkoliv je některých ze jmenovaných mechanismů využito nebo se vyskytují v instrumentální technice, jež byla během tvorby této práce upotřebena, podrobnější popis většiny z nich je pro účely práce nepříliš podstatný, a proto většině z nich nebude v této kapitole věnována další pozornost. Některé z procesů budou přiblíženy v nadcházejících kapitolách.

## 2.1.3 INTERAKCE ZÁŘENÍ S HMOTOU ZA VÝMĚNY ENERGIE

### 2.1.3.1 LAMBERT-BEERŮV ZÁKON A ODCHYLKY OD NĚJ

Při průchodu hmotou klesá intenzita záření exponenciálně se vzdáleností. Ztráta energie záření tedy mimo druhu a *koncentrace*  $c$  absorbující látky závisí na vzdálenosti, kterou muselo záření na své cestě látkou urazit, nebo jinak na *tloušťce vrstvy*  $l$  takové látky. Veličina, pomocí níž je úbytek zářivého toku kvantifikován, se nazývá *absorbance*  $A$  (dříve *extinkce*  $E$  [15]). Jedná se o dekadický logaritmus poměru zářivého toku před vstupem do prostředí  $\Phi_0$ , jenž je značen s nulou v indexu, a zářivého toku po té, co záření látku opustilo  $\Phi$ . Zářivé toky se udávají relativně, takže na vstupu do vzorku dosahuje  $\Phi_0 = 100\%$ , pročež na odchodu ze vzorku má zářivý tok  $\Phi < 100\%$ . [1-5,8,10,16] Absorbance je aditivní, to znamená, že celková absorbance je sumou absorbancí všech látek obsažených v případné směsi, které tento jev způsobují. [1-3,5]

Vztah, který dává všechny řečené veličiny do vzájemného vztahu, se nazývá **Lambert-Beerův zákon** (3). Konstantou úměrnosti rovněž ve vztahu figurující je tzv. *molární absorpční koeficient*  $\varepsilon_\lambda$  pro absorbující látku při vlnové délce  $\lambda$ , jehož rozměr  $\text{dm}^3 \cdot \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  kompenzuje jednotky zbylých veličin tak, aby absorbance zůstala bezrozměrná. [1-5,8,10,15,16]

$$\log \frac{\Phi_0}{\Phi} = A = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot l \quad (3)$$

Zářivý tok procházející látkou může být snižován i jinými jevy než absorpcí, a to např. rozptylem záření na velkých částicích (agregátech molekul při turbidimetrických měřeních). Byl proto zaveden termín *optické hustoty* zkracovaný jako *OD*

(z angličtiny: *optical density*), jenž je definován stejným logaritmickým poměrem jako absorbance, avšak jí zůstává nadřazený. [4,5,15]

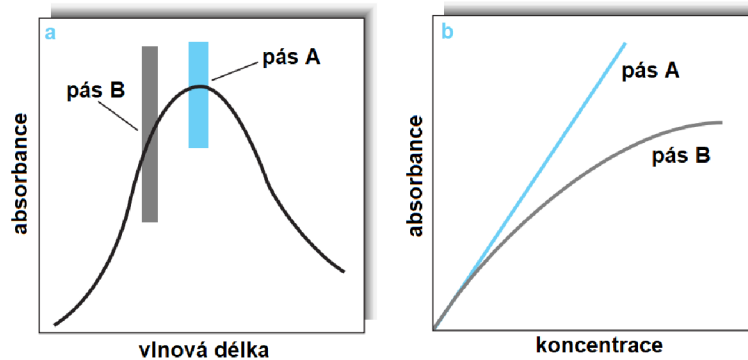
Alternativou, s níž se dá rovněž popsat míra pohlceného záření látkou, tentokrát z hlediska množství záření, které látkou zadrženo nebylo, je *propustnost* nebo též *transmittance*  $T$ , jež se obvykle uvádí v procentech. Její vyjádření (v %) je potom zachyceno v rovnici (4). Z rovnice (3) je též patrný vztah transmittance s absorbancí. [1-5,8-10,15,16]

$$T = \frac{\Phi}{\Phi_0} \cdot 100 \quad (4)$$

Lambert-Beerův zákon je nicméně ve své plné podobě platný pouze u koncentrací pod kritickou mezí. U většiny absorbujících molekul je za vyšších koncentrací běžné pozorovat odchylku od linearitu přímky získané vnesením závislosti míry absorbance na koncentraci do grafu. Toto je způsobeno tvorbou agregátů, interakcemi rozpuštěné látky s rozpouštědlem, ba dokonce i přítomností vodíkových vazeb. [3-5,8,13,17]

Zákon nabývá přesnosti výhradně za předpokladu používání záření jediné vlnové délky – to sice není realisticky zcela dosažitelné, ale současná technika je již schopna takovéto zdroje chybovosti redukovat. Není-li použitý rozsah spektra příliš úzký a záření proudící vzorkem tak není monochromatické, dochází pak k odchylce od znění tohoto zákona. Tento fakt může být ještě podpořen nevhodným umístěním pásu vzhledem k míře změny absorpčních vlastností látky v této oblasti, jak je uvedeno dvojicí vybraných pásů A a B na obrázku (Obr. 1). Zatímco v případě pásu A vychází závislost  $A$  na  $c$  (b) pro svou relativní stálost absorpční křivky (a) lineární, pás B, který byl vybrán mimo absorpční maximum, a tedy v regionu příkrého stoupání, vykazuje zakřivení. Za dopad záření jiné než kýžené vlnové délky může být odpovědné i odrazové záření od komponentů měrného přístroje. [3-5,8,13,17,18]





Obrázek 1 Vliv polychromatického záření na Lambert-Beerův zákon: a) závislosti vlnové délky na absorbanci, b) závislost absorbance na koncentraci [3]

Chemickými faktory ovlivňujícími platnost zákona mohou být také změny ve složení způsobené jak změnou pH používané matrice, tak i kupříkladu komplexotvornou reakcí s jinou ve vzorku obsaženou látkou. Změnou chemické struktury dochází ke změně rozložení hladin energií, což vede ke změně absorpčních vlastností a tedy i k odlišným absorpčním spektrům a tím i ke změně zbarvení. V neposlední řadě pak odchylku může způsobit neshoda parametrů mezi květami nesoucími vzorek. [3,4,8,17] Některé z těchto procesů jsou blíže popsány níže v kapitole 2.1.3.3.1. *Fluorescence*.

Části molekul, jež zapřičiňují absorpci elektromagnetického záření v UV/VIS oblasti a jsou tak odpovědné za její zbarvení, jsou nazývány *chromofory* (z řeckého výrazu pro „nosič barvy“). Příkladem chromoforů s charakteristickou absorpcí v UV/VIS jsou u organických molekul kupříkladu aromáty (200 – 250 nm) nebo ketoskupiny (kolem 300 nm). [3,4,8,9] Absorpci působené chromoforem mohou napomáhat taky jemu přilehlé funkční skupiny obsahující p-elektrony (např. skupiny -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH, -X, ...) zvané *auxochromy*. Jejich přítomností v blízkosti chromoforu tak dochází ke dvojici efektů: *hyperchromnímu*, při němž auxochrom výrazně posiluje molární absorpční koeficient  $\epsilon$  (a tím pádem absorpčních maxim) a *hypochromnímu*, při němž dochází k opaku efektu předešlého, tedy ke snížení  $\epsilon$  a schopnosti látky při dané vlnové délce absorbovat záření. [3,4,8]

Použitím vhodného rozpouštědla nebo změnou teploty je možno dosáhnout přesunu absorpčních maxim do oblastí nestejných vlnových délek. U n- $\pi$  přechodů je obvyklý tzv. *hypsochromní* (též *modrý*) posun směřující maximum ke kratším vlnovým délkám. Posunu na druhou stranu, tedy k delším vlnovým délkám, tzv. *batochromního* (*červeného*) posunu se molekula dočká zpravidla v případě  $\pi$ - $\pi$  přechodů. Jestliže jsou skupiny

auxochromů konjugovány s chromofory obsahujícími  $\pi$ -elektrony, mohou v mnoha případech rovněž působit posunem absorpce k delším vlnovým délkám. [3,4,8]

### 2.1.3.2 TYPY PŘECHODŮ

Obecnou platností vesmíru je, že se vše snaží dosáhnout stavu s co nejnižší energií. Většinu látek tak nalézáme v tzv. *základních* stavech disponujících co možná nejnižší energií, kteréžto stavy jsou energeticky nejvýhodnější. Za běžného atmosférického tlaku pokojových teplot se v základním stavu nachází opravdu většina látek. Jakmile ale dojde k pohlcení energie nesoucího záření látkou, veškerá nebo část jeho energie může být spotřebována k převedení částic látky do vyšších energetických stavů, tzv. stavů *excitovaných*. Podle množství spotřebované energie a související změně stavu jde o:

- a) **elektronové přechody**, jež obnášejí přenos elektronů, a to ať už těch tvořících chemické vazby, anebo elektronů volných (v ne vazebných elektronových párech) do vyšších energetických hladin nebo též vzbuzených stavů. Na takovéto typy přechodů jsou zapotřebí významná kvanta energií (150 až 627 kJ mol<sup>-1</sup>), a tedy k nim dochází v oblastech relativně krátké vlnové délky (UV/VIS). Z výčtu přechodů je tohoto typu využíváno právě fluorescenční spektrometrií, a proto mu bude v této práci věnována největší pozornost;
- b) **přechody do vyšších vibračních stavů**, při nichž dochází ke změně typů oscilací (valenčním, kdy se mění délky vazeb i deformačním, kdy se mění úhly, jež vazby svírají) částí ozářených molekul a které jsou energeticky méně náročné (4 až 150 kJ mol<sup>-1</sup>) než přechody elektronové. Vyskytují se proto zejména po vystavení záření vlnových délek blízké infračervené oblasti (NIR) a oblasti střední infračervené (MIR). Znalost vibračních stavů je nesmírně užitečná v infračervené a Ramanově spektrometrii, zvláště kvůli své tzv. oblasti *otisku prstu*, která je charakteristická pro každou látku a je z ní tedy možná velice přesná identifikace. Podmínkou absorpce infračerveného záření je *nemulová změna dipólového momentu* během přechodu do vyššího stavu;
- c) **změny rotační energie molekuly**, jež jsou zodpovědné za rotaci molekul kolem jejich center hmotnosti. Jsou k nim zapotřebí jen velmi malá kvanta energie (0,01 až 4 kJ mol<sup>-1</sup>) dodávaná zářeními zejména daleké infračervené oblasti (FIR) a oblasti mikrovlnné. U pevných a kapalných látek zpravidla nejsou změny rotací

molekul pozorovány a k výraznému štěpení spekter, u nichž by byly vibrační čáry výrazné, dochází obvykle u plynů. [1-3,5,8,13]

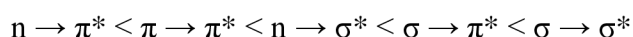
Z rovnice (2) je zřejmé, že množství energie, k jejíž výměně dojde, je kvantováno a plně souvisí s energiemi hladin, mezi kterými k přechodu došlo.

### 2.1.3.2.1 BĚŽNÉ ELEKTRONOVÉ PŘECHODY

Při absorpci záření UV a viditelné oblasti tedy dochází ke změně rozmístění elektronů v atomových, resp. molekulových, orbitalech, a sice k přechodu valenčních elektronů z vazebných ( $\sigma$ ,  $\pi$ ) a z nevazebných ( $n$ ) orbitalů na vyšší energetické hladiny značené hvězdičkou jako  $\sigma^*$  a  $\pi^*$ . [3-5,8,13,14,19]

Přechody typu  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  pochází z jednoduchých vazeb (například alifatických uhlovodíků). Látky, jež ve své struktuře pojmají nevazebné elektrony (jako např. voda, alkoholy, nebo halogenderiváty), poskytují přechody typu  $n \rightarrow \sigma^*$ . Neboť setrvávání elektronů v nevazebných orbitalech není tolik energeticky výhodné jako pro elektrony sigma vazeb ( $n$  e<sup>-</sup> mají v základním stavu vyšší energii), jejich přesun do téže excitované hladiny vyžaduje o tuto energii ochuzené množství do systému vložené energie. Obdobně, vzhledem k menšímu překrytí p-atomových orbitalů, je  $\pi$ -vazba slabší než  $\sigma$ -vazba, a proto pro jejich vybuzení postačuje záření o delších vlnových délkách.

Přechody  $\pi \rightarrow \pi^*$  způsobují především konjugované systémy dvojných vazeb a funkční skupiny bohaté na  $\pi$ -elektrony. V neposlední řadě jsou zde nevazebné elektronové páry lokalizované na atomech vázaných dvojnou vazbou (např. ketoskupiny C=O), které jsou zodpovědné za přechody typu  $n \rightarrow \pi^*$ . Systémy více konjugované k přechodu potřebují méně energie. [3-5,8] Obecně se dá tvrdit, že jednotlivé typy elektronových přechodů tvoří podle množství k nim potřebné energie řadu:



V souvislosti s touto problematikou byla zavedena dvojice pojmů vycházející z teorie molekulových orbitalů (MO – LCAO) rozlišující orbitaly na HOMO (z angličtiny: *highest occupied molecular orbitals*), tedy nejvyšší obsazené a na LUMO (*lowest unoccupied molecular orbitals*), tedy nejnižší neobsazené. Obě označení se týkají základního

nevybuzeného stavu molekuly. [3-5,8,14,19] Pro ilustraci jsou na schématu (Schéma I) zmiňované přechody aplikovány na molekulu formaldehydu.

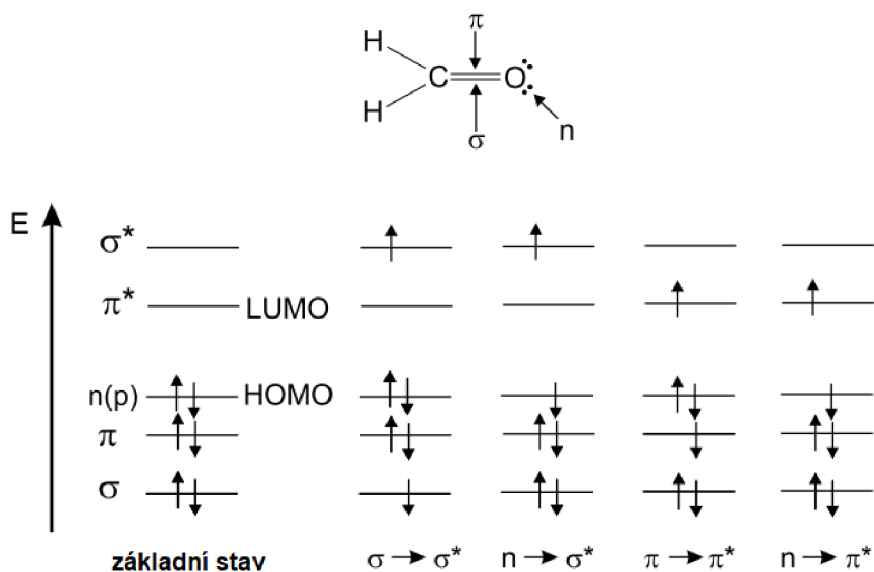


Schéma I Energetické hladiny molekulových orbitalů v molekule formaldehydu a možná rozmístění elektronů v základním stavu a po průběhu elektronových přechodů [4]

Rychlost elektronových přechodů je velmi vysoká ( $10^{-15}$  s) [4]. Neboť je hmotnost elektronu v porovnání s hmotností atomů v molekule nesčetněkrát menší, projeví se změna pozice atomu vlivem přechodu do vyšší orbity elektronem jen velice slabě, a proto je v rámci elektronových přechodů změna pozice atomu zanedbávána a meziatomové vzdálenosti v molekule jsou proto chápány jako nezměněné. Tato skutečnost je známa jako tzv. *Franck-Condonův princip*, který mimochodem rovněž vysvětluje, proč jsou některé elektronové přechody pravděpodobnější než jiné. Přechod z jedné vibrační hladiny do druhé je během elektronového přechodu tím pravděpodobnější, čím k většímu překrytí vlnových funkcí daných stavů, mezi nimiž elektron putuje, dochází. Během elektronových výměn tak nedochází k výrazným změnám mezi vibračními hladinami při přechodu mezi základními a excitovanými stavy. [1,3,4,9,13,20-22]

### 2.1.3.2.2 SPECIÁLNÍ ELEKTRONOVÉ PŘECHODY

Vstřebáním energie může v některých případech dojít k tzv. *přenosu náboje* někdy značenému jako *CT* (z anglického: *charge transfer*). Během tohoto jevu je elektron přesouván buďto mezi dvojicí molekul, nebo dvěma částmi téže látky (u komplexních iontů, organických i anorganických molekul), tedy k vnitřní oxidačně-redukční reakci.

Podmínkou v takovém případě je přítomnost volného elektronu a tendence zbavovat se jej na jedné reagující entitě a afinita entity druhé. Zdroj elektronu se tak stává elektronovým donorem a molekula akceptorem. K tomu, aby mezi částicemi k přenosu náboje došlo, je vyžadována jejich vzájemná blízkost. [4,5,9,12,14,19]

U komplexních sloučenin přechodných kovů s částečně zaplněnými d a f orbitaly může rovněž dojít ke vstřebání energie a přesunu elektronu na vyšší hladinu. To je umožněno přítomností **ligandového pole** energeticky zvýhodňující některé orbitaly vůči jiným podle jejich prostorového uspořádání a směřování mezi ligandy komplexu, které jinak degenerované orbitaly štěpí svým elektrostatickým polem a způsobují tvorbu více hladin, mezi nimiž je v některých případech elektronům za předpokladu dostatečné energie umožněno přecházet. Typ zvýhodněného orbitalu a jemu náležící množství energie se odvíjí od počtu a rozmístění ligandů v jejich blízkosti. [3,4,14,19]

### 2.1.3.2.3 ZAKÁZANÉ ELEKTRONOVÉ PŘECHODY

Spin je vnitřní relativistickou vlastností elektronu kvantifikující jeho moment hybnosti. Podle Pauliho vylučovacího principu, který zakazuje koexistenci elektronů v témže kvantovém stavu, tj. nemohou mít v atomu všechna svá kvantová čísla stejná, a proto, jestliže se dva elektrony nacházejí v témž molekulovém orbitalu, musí být jejich hodnoty spinů vzájemně protichůdné, jako tomu bylo u molekuly formaldehydu (Schéma I).

Jakmile je jeden z dvojice elektronů přesunut do molekulového orbitalu o vyšší energii, jeho spin by měl z principu výběrových pravidel zůstat nezměněn. Celkové spinové kvantové číslo  $S$  by tak dle výpočtu, kdy  $S = \sum s_i$ , přičemž  $s_i$  nabývá hodnot  $+\frac{1}{2}$  a  $-\frac{1}{2}$ , mělo zůstat rovno nule.

Multiplicita stavů  $M$ , jež může být spočtena ze vztahu  $M = 2S + 1$ , je tedy rovna jedné, odkud pochází označení tohoto stavu, a sice *singlet* nebo *singletový stav* (ten se pro základní stav značí  $S_0$ , a v případě následujících excitovaných stavů  $S_1, S_2, \dots$ ). Takovýto typ přechodu se nazývá *singlet-singletový*. [1-4,10,13,14,20]

Není však vyloučený přechod z výše položeného singletového stavu do stavu tzv. *tripletového*, jehož celkový spin je roven 1 (elektrony jsou vůči sobě paralelní, tedy mají oba hodnotu  $+\frac{1}{2}$ ) a jeho multiplicita je 3. Takovýto přechod může být označován

rovněž jako přechod mezisystémový. [21,23] Podle jedné z podmínek *Hundova pravidla* mají členy téže elektronové konfigurace s nejvyšší multiplicitou nejnižší energii, a tedy mají tripletové stavy oproti singletovým stavům téže hladiny nižší energii. [3-5,10,14]

Přesuny elektronů mezi jednotlivými hladinami nejsou umožněny zcela bez omezení. Vztahují se na ně tzv. *výběrová pravidla* členící přechody na *povolené* a *zakázané* podle pravděpodobnosti jejich výskytu a to na základě spinových vlastností a symetrie. Tedy:

- a) *spinově zakázané přechody* jsou takové typy přechodů, které se odehrávají mezi stavy o nestejně multiplicitě (tedy singlet-singletové a triplet-tripletové přechody pravidlo neporušují, singlet-tripletové a triplet-singletové ano). Ačkoliv by k takovým přechodům tedy docházet nemělo, je možné je i tak pozorovat (i přes poměrně slabé  $\epsilon$ ), za čímž stojí spin-orbitalové interakce. Ty způsobují, že vlnové funkce definující charakter singletového stavu obsahují jako vedlejší složku i část stavu tripletového a vice versa, což vede k malé, avšak nezanedbatelné možnosti přechodu mezi nimi – ty jsou ale nepříliš pravděpodobné, a proto ve většině případů ani časté [3,4,12,22]
- b) *symetricky zakázané přechody* jsou takové typy přechodů, při nichž není při přechodu z počátečního do koncového elektronového stavu dodrženo tzv. Laportovo pravidlo, tedy nedochází ke změně parity (oběma stavům např. zůstává stejná symetrie vůči středu symetrie). [3,4,12] Jelikož i zakázané přechody nastávají s velice malou pravděpodobností, v absorpčních spektrech látek se příliš neprojevují.

### 2.1.3.3 LUMINISCENCE

Při interakci elektromagnetického záření se vzorkem dochází u některých látek ke tvorbě tzv. *sekundárního záření*. To však na rozdíl od fenoménu *inkandescence*, jehož záření se označuje jako „*horké světlo*“, není způsobeno vlastní vysokou teplotou, protože je luminiscenci mnohdy přezdíváno „*chladné světlo*“ [4,11]. Úkaz je způsoben přechodem elektronů z excitovaných hladin zpět na hladinu základní, čímž dochází k uvolňování energie a tedy k emisi záření. [2,4,5,8,11-13,15,20]

To efektivně znamená, že jej produkuje samotná látka a nikoliv vnější zdroj, ačkoliv i tak bylo energii nutno zprvu do systému odněkud dodat, a to jak už dopadem fotonu (jev zvaný *fotoluminiscence*), tak i chemickou reakcí (*chemiluminiscence*, u živých organismů *bioluminiscence*), působením ionizujícího záření (*radioluminiscence*), mechanickým porušením materiálu (*triboluminiscence*) atp. [4,11] Látky, jež jsou takovychto procesů schopné, jsou označovány za *luminofory*. [3,4,11]

Fotoluminiscence je limitována na systémy, u nichž jsou nezářivé deexcitační (též deaktivací) procesy zpomaleny natolik, aby jim ty svítivé mohly kineticky konkurovat. Upřednostňovaný typ přechodu je totiž ten nejrychlejší. [3]

Způsobů, jakými se může excitovaný elektron navrátit do základního stavu, je hned několik. Pro přehlednost jsou přechody spolu s elektronovými stavy znázorňovány pomocí tzv. *Jablonského diagramu* (Schéma II), jenž nese své jméno po polském fyzikovi Aleksanderu Jablonském, který s jejich pomocí jako první vysvětlil absorpční a emisní přechody. [3,48,16,20,22]

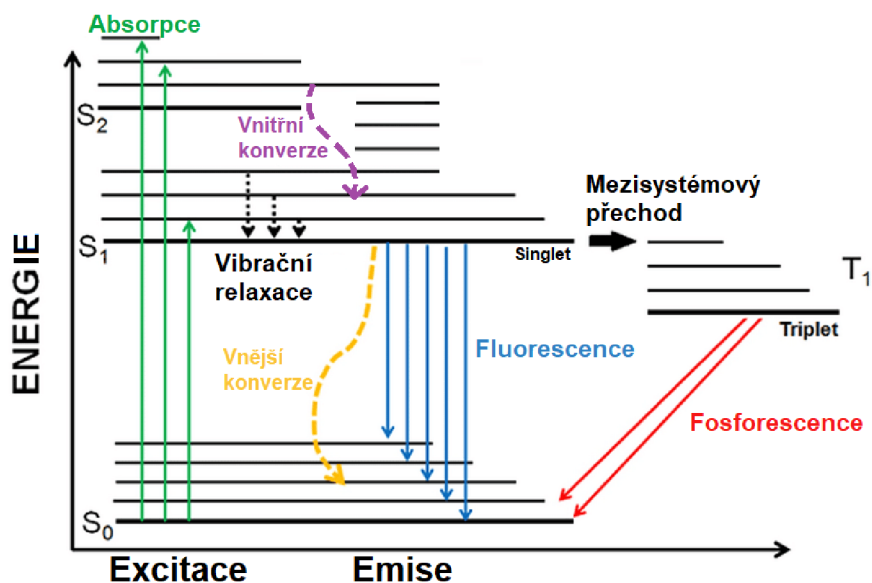


Schéma II Jablonského diagram [21], (upraveno)

Ze schématu (Schéma II) je patrných hned několik typů přechodů. O principech excitace, emise i mezisystémových přechodů již bylo psáno dříve. Po uskutečnění absorpce je elektron, jak již bylo výše uvedeno, excitován na vyšší energetickou hladinu – ta však sestává z mnoha hladin vibračních (ve schématu značeny užšími vodorovnými čarami) a rotačních (pro přehlednost nejsou zobrazeny), mezi nimiž může přecházet na nižší elektronové hladiny po uvolnění energie molekulou její vibrací (proces *vibrační relaxace*).

Takovýmto způsobem, zvaným *vnitřní konverze*, může molekula dojít nikoliv pouze do nejnižšího vibračního stavu dané elektronové hladiny v bezprostředním okolí (k čemuž dochází prakticky okamžitě po absorpci), nýbrž také až do některé z hladin svého základního stavu  $S_0$  (*Kaschovo pravidlo*); to vše, aniž by došlo k emisi fotonu – jedná se o proces nezářivý. Přesun elektronu do nižších stavů nezářivými procesy se označuje jako *vyhasínání*. Dalším nezářivým procesem je tzv. *vnější konverze*, při níž dochází rovněž ke ztrátě energie a přechodu do nižších hladin, tentokrát však v důsledku vnějších vlivů. [3,4,8,20-22]

Ztráta zářivého toku emisního záření je označována pojmem *zhášení* (anglicky *quenching*). Příkladem jeho vlivů mohou být srážky s částicemi jiných molekul (tzv. *zhášedla*) v daném prostředí (proces dynamického zhášení), srážkami s částicemi týchž molekul za záření odpovědné mezi sebou (koncentrační zhášení, nebo sebezhášení), či skrze tzv. statické zhášení, jež zahrnuje tvorbu tzv. „temných komplexů“ látek ve směsích. [3,5,8,9,20-22] Ke zhášení může dojít i jinými cestami, a to například dlouhým vystavením excitačnímu záření, tzv. fotovybělením (i v češtině je však mnohem častěji používán anglický pojem photobleaching). Toto je chemické zhášení a může mít pro zářivé vlastnosti molekuly trvalé účinky, a sice že tato vlastnost může být luminoforům odebrána. V neposlední řadě dochází i k takřčenému Försterově zhášení zapříčiněném dipól-dipólovému párování excitovaných látek. [9,21]

### 2.1.3.3.1 FLUORESCENCE

Jedním ze dvou dosud nepopsaných přechodů ze schématu (Schéma II) je podskupina luminiscence zvaná *fluorescence*. Jedná se o typ deaktivčního přechodu mezi dvojicí singletových stavů, při němž je z látky vyzařován foton kterýmkoliv směrem a to prakticky v okamžiku počátečního dodání energie molekule (jev nastává po uplynutí desítek či pouhých zlomků nanosekund, bližší údaje se liší zdroj od zdroje). [4,8-11,16,20,22] Nejčastěji a s největší intenzitou se vyskytuje v molekulách dovolujících energeticky nepřilíš náročné přechody  $\pi \rightarrow \pi^*$ . [4,8-10] Empiricky bylo prokázáno, že je obzvláště upřednostňována u systémů rigidních struktur. [3,5] Chromofor odpovědný za fluorescenci se nazývá *fluorofor* (nebo fluorochrom). [3,5,9-11,16,20-22]

Míru či efektivnost, s jakou k fluorescenci dochází, tedy sílu vyzařování fluoroforu, vyjadřuje pojem *kvantového výtěžku fluorescence*  $Y_F$ . Ten je roven poměru počtu fotonů



emitovaných látkou ve formě fluorescence  $n_F$  a počtu fotonů látkou absorbovaných  $n_A$ . Vyjádřit lze zároveň i pomocí počtu zářivých přechodů  $I$  a sumou všech nezářivých přechodů  $k$ , jak je znázorněno v rovnici (5). Značení není univerzální a v závislosti na použité literatuře bývá pro vyjádření veličin používáno různých symbolů. [3,5,9,10,20,22,24]

$$Y_F = \frac{n_F}{n_A} = \frac{I}{I+k} \quad (5)$$

S jeho pomocí lze mezi sebou pouhým vynásobením přepočítávat zářivé toky absorbovaného  $\Phi_A$  a fluorescenčního  $\Phi_F$  záření, jak je vidno v rovnici (6). [3,4,10] Je-li v roztoku přítomno více fluoreskujících látek o nízkých koncentracích, je možné jejich fluorescenční zářivé toky sečíst. [10]

$$\Phi_F = Y_F \cdot \Phi_A \quad (6)$$

Jak je v rovnici (5) naznačeno, fluorescence závisí na počtu nezářivých procesů včetně vibrační relaxace, která je hnána tepelnými procesy, a tedy její síla bude klesat s narůstající teplotou, neboť se tím zvýší frekvence kolizí s částicemi okolí a pravděpodobnost přenosu energie v podobě vnější konverze, tedy stejný efekt, jaký poskytuje snížení viskozity. [3,4,8]

Zvláště pro aromatické látky s kyselými anebo bazickými substituenty je pro správný průběh absorpce nutno dodržovat správného rozsahu pH prostředí, neboť ne/přítomnost jediného protonu může rozhodovat o přítomnosti rezonančních forem, jako je tomu třeba v případě anilinu. Analytická měření založená na absorpci a související fluorescenci je proto vhodné provádět v prostředích o kontrolovaných kyselostech. [3,4,8]

V nejjednodušším případě, a sice že v prostředí se nachází jediná látka schopná fluorescence (o určité vlnové délce  $\lambda$ ), nabývá absorbovaný zářivý tok  $\Phi_A$  podoby

$$\Phi_A = \Phi_0 \cdot (1 - 10^{-A}) \quad (7)$$

kde  $A$  značí absorbanci (vyjádřitelnou vztahem (3)) a  $\Phi_0$  zářivý tok excitačního záření v momentu před vstupem do prostředí. Tento zápis může být rozepsán do názornější formy

$$\Phi_A = \Phi_0 \cdot \left[ 2,303 \varepsilon \cdot c \cdot l - \frac{(2,303 \varepsilon \cdot c \cdot l)^2}{2!} + \frac{(2,303 \varepsilon \cdot c \cdot l)^3}{3!} - \dots \right] \quad (8)$$

Z tohoto (8) vztahu je již patrné, že zatímco pro nízké koncentrace (uvažuje se pro  $A < 10^{-2}$ ) je příspěvek zlomků obsahujících v čitateli umocněné členy zanedbatelný, při jejím zvýšení hrají na podobu závislosti výraznější roli. [3,4,8,10] Pro nízké hodnoty absorbance je tedy možno vztah (8) aproximovat, pročež po jeho zakomponování do vztahu (6) pro fluorescenční zářivý tok  $\Phi_F$  vyplyne

$$\Phi_F = Y_F \cdot \Phi_0 \cdot 2,303 A \quad (9)$$

### 2.1.3.3.2 FOSFORESCENCE

Dalším podtypem fotoluminiscence je fosforescence. Ta má oproti fluorescenci podstatně delšího trvání, a to až několika sekund či dokonce minut (přesnější rozsah se opět liší dle užití literatury) po ukončení procesu k ní vedoucímu, což přímo souvisí s nutností elektronu změnit na své cestě do některé z hladin základního stavu orientaci svého spinu. Jelikož je tento mezisystémový přechod nepříliš pravděpodobný, jeho absorpční spektra jsou výrazně slabší než spektra jeho singlet-singletového analogu. Za pokojových teplot bývá jev u kapalných látek navíc poměrně vzácný z důvodu přítomnosti velkého množství kineticky mnohem přijatelnějších cest uvolnění energie (proces je velice snadno zhašen). [3-5,8,10,11,13,20,22]

Ačkoliv jde o jev od fluorescence bezpochyby odlišný, v mnohém zůstává velice podobný (v obou případech jde koneckonců o luminiscenci) a vztahují se na něj tedy stejné závislosti popsané v předešlé podkapitole vedoucí ke vztahu (9).

### 2.1.3.3.3 RAMANŮV ROZPTYL

Úkaz, při němž dochází ke změně vlnové délky záření, aniž by byla látka excitována do vyššího elektronového stavu, se nazývá *Ramanův rozptyl*. Ten se na první pohled jeví být velmi podobný fluorescenci – i zde je emise radiace doprovázena změnou vlnové délky oproti té do interakce vstupující. Nicméně zatímco je u fluorescence primární záření absorbováno, aby mohlo k produkci Ramanova záření dojít, absorbováno být *nesmí* a energie je odebrána přímo z příchozího fotonu. [3,5,8,12,18] Podmínkou pro jeho vznik je polarizabilita částice, tedy její schopnost podrobit se změně polarizace vlivem vnějšího elektrického pole, k níž během srážky dochází. [3,5,8,12]

Má-li emitované záření nižší energii než záření původní, hovoří se o tzv. *Stokesově posunu*. [3-5,8,9,12,18,21,22] Může ale rovněž dojít k situaci, kdy foton energii od částice naopak získá. To se odehrává u snadno excitovatelných molekul ve vyšších než nejnižších vibračních hladinách základního stavu. Označuje se pak jako *anti-Stokesův posun*. Oproti Stokesově posunu však není tolik upřednostňován a jeho intenzity projevující se ve spektrech nabývají výrazně nižších hodnot. Zmíněné procesy jsou vyobrazeny na následujícím schématu (Schéma III). [3-5,8,9,12,18,20] Rozptyl, během něhož nedojde k výměně energie mezi látkou a fotonem, se nazývá *Rayleighův*. [3,5,8,12,18,22]

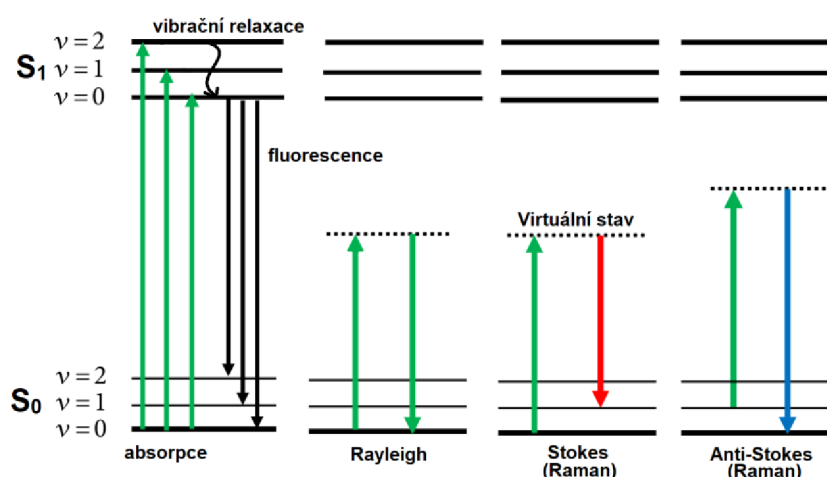


Schéma III Znázornění Rayleighova a Ramanova záření ( $S_0$ ,  $S_1$  jsou elektronové hladiny s přidruženými vibračními hladinami  $\nu_0$ ,  $\nu_1$  a  $\nu_2$ ) [18], (upraveno)

Pro velké množství molekul (zvláště organických) platí mezi absorpčním a fluorescenčním pásem u Stokesova posuvu zrcadlová symetrie (Schéma IV). To je způsobeno stejnou relativní pravděpodobností obou procesů z týchž vibračních hladin. Výjimky z této symetrie zpravidla náležejí látkám, jež s přechodem do excitovaných stavů mění geometrické uspořádání svých atomových jader. [3-5,9,18,20,22]

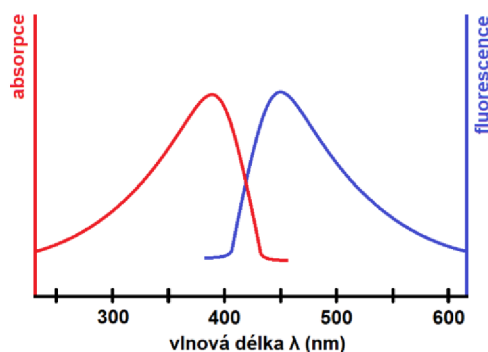


Schéma IV Zákon zrcadlové symetrie absorpčního a fluorescenčního spektra

## 2.2 SPEKTROFLUORIMETRIE

*Fluorescenční spektrometrie*, nebo jednoslovně *spektrofluorimetrie* či případně pouze *fluorimetrie*, je spolu s fosforimetrií příkladem *fotoluminiscenčních* analytických metod spadajících pod *emisní spektrální analýzu*. V porovnání s fosforimetrií je fluorimetrie v analytické chemii výrazně populárnější a upřednostňovaná. [3-5,8,16]

Jedná se o nedestruktivní metodu využívající pro analýzu interakce excitačního záření (zpravidla UV/VIS oblasti) se vzorkem, protože látka podle procesů popsaných v dřívějších kapitolách při své relaxaci na nižší energetické hladiny vydává fluorescenční záření, jež se měří a z hodnot jeho intenzity se vyvozují látková množství takto působící látky ve vzorku, a to ať už plynném, kapalném, nebo pevném. [3-5,8,10,16,20] Oproti ostatním metodám absorpční spektrální analýzy má fluorescence až 1000krát nižší mez detekce LOD (z angličtiny: *limit of detection*). [3,4]

Mimo kvalitativní analýzy je fluorimetrie schopna i kvantitativní analýzy, avšak pouze pro ono neveliké množství látek, jež po ozáření fluorescenci vykazují. Jedná se tedy o metodu specifickou. Používá se tedy jak k důkazům (kvalitativní stanovení), tak i kvantitativním stanovením stopových množství fluoreskujících látek ve vzorcích. [3-5,8,16] Závislost mezi tokem vznikuvšího sekundárního záření na koncentraci jej produkující látky je zpravidla zjišťována empiricky (pokusem).

Nástroje používané pro měření fluorescenčního záření jsou známé pod názvem *fluorimetry*, ale lze narazit i na označení *fluorometry* nebo *fluorofotometry*. [3-5,8,10,16] Jestliže je přístroj možno použít i k proměření excitačních a emisních spekter, bývá tato možnost zdůrazňována označením přístroje za *spektrofluorimetr*. [3,10,25] Tradičně v sobě obsahují *zdroj záření* schopného určitého rozsahu vlnových délek, *optiku* napomáhající ke správnému usměrnění (kolimaci) paprsku záření do co nejužšího proudu. Optika rovněž slouží k výběru konkrétních úzkých intervalů vlnové délky, z nichž jedním je vzorek excitován, zatímco druhý vymezuje oblast, při níž je sekundární záření zachycováno na *detektoru* a převáděno na informaci o jeho intenzitě. Pro výběr vlnové délky a zredukování intenzity záření mohou být případně použity i *filtry*. Vzorky určené k analýze jsou umísťovány do *kyvet* nebo průtokových cel (přístroj může být napojen na výstup jiného, např. chromatograf). [3-5,8,10,16] Přístroje zpravidla obsahují také *shuttery* (clony), jež slouží k mechanickému zabránění proudu fotonů. [3-5,8,10,16]

Prostorové rozmístění jednotlivých složek není pevně dané a mohou se lišit, přístroj od přístroje, v závislosti od modelu a výrobce.

Při základním, nejrozšířenějším uspořádání (Schéma V) pro jednopaprskový spektrofluorimetr je emisní záření pozorováno pod úhlem  $90^\circ$  od směru paprsku vstupujícího excitačního záření. Je tomu tak proto, aby nedocházelo k chybě způsobené přičtením intenzity původního paprsku k intenzitě toho odchozího při umístění detektoru přímo naproti zdroji. [3-5,8,25]

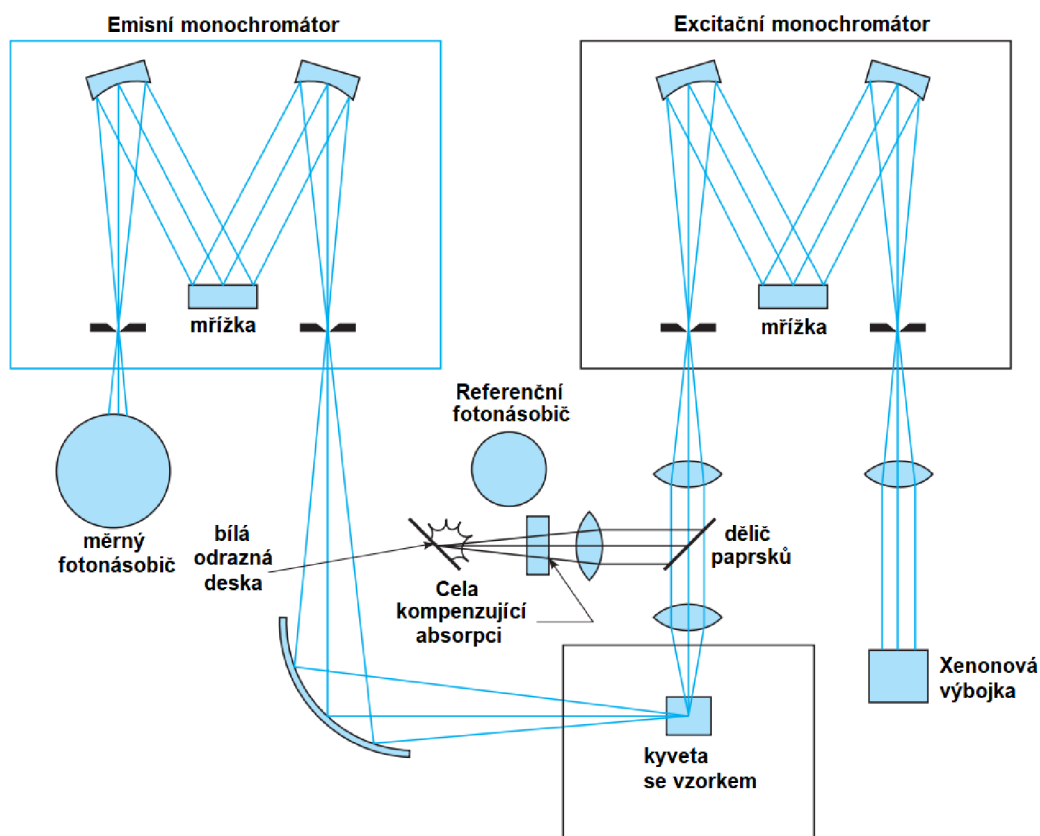


Schéma V Spektrofluorimetr (model: Courtesy of Horiba Jobin Yvon, Edison, NJ.) [3]

Tato  $90^\circ$  konstrukce však není zcela dokonalá. Výhodnější, zvláště pro měření roztoků, v nichž dochází k turbulencím, nebo u těch, kde dochází k absorpci záření na téže vlnové délce užívané k pozorování (výraznému zhášení), je však rozmístění pod co nejmenším úhlem od směru vstupujícího záření. Sekundární záření je tak pozorováno z téhož povrchu částic, na kterém dochází k absorpci, čímž je jeho intenzita nejsilnější a vzdálenost, jíž musí skrz matici roztoku urazit, je nejmenší. [5,25] Přesto se pro praktičnost rozmístění dílů přístroje upřednostňuje pozorování pod pravým úhlem.

### 2.2.1 ZDROJE ZÁŘENÍ

Neboť je podle rovnice (9) mez detekce měření měření závislá od fluorescenčního zářivého toku  $\Phi_F$ , používají se jako zdroje záření ve fluorescenční spektrometrii zdroje s co největší svítivostí. [3,4,8,10] Zatímco u fluorimetrů mnohdy pro své velké množství spektrálních čar, z nichž alespoň jedna zpravidla umožňuje excitaci většiny fluoreskujících sloučenin, postačuje nízkotlaká rtuťová výbojka, nebo jsou jako zdroj záření využívány lasery, spektrofluorimetry, jak bylo zmíněno, vyžadují spjité zdroje záření (pokud možno napříč vlnovými délkami málo kolísajícího na intenzitě) ultrafialové a viditelné oblasti. K tomu se velice často využívá:

- a) *Xenonové výbojky*, [3,4,8,10,16,25] jejíž kontinuum se nachází v rozmezí přibližně 300 – 1 300 nm, avšak směrem ke kratším vlnovým délkám se její záření značně zeslabuje,
- b) (především modrých) *světlo emitujících diod* neboli **LED** žárovek (z angličtiny: *light emitting diodes*), jež jsou využitelné pro vybuzení těch fluorofor, které mají silná absorpční spektra v rozsahu asi 25 – 30 nm (pro modré LED mezi 450 a 475 nm),
- c) pro UV region (cca 180 – 380 nm) *deuteriová* výbojka, nebo *vodíková* žárovka svým rozsahem rovněž nepřesahující 380 nm. [3-5,16]

Záření se šíří všemi směry. Je proto vhodné pro záření vzniklé na zdroji vyčlenit prostor, kterým bude pronikat dále do systému. Děje se tak za pomoci štěrbin propouštějící jen úzký paprsek.

### 2.2.2 MONOCHROMÁTORY

Jelikož jsou spektrofluorimetry na rozdíl od fluorimetrů nutny proměřovat spektra, bývají pro tento účel vybaveny minimálně jedním, častěji přímo dvěma, monochromátory, podle jejich umístění rozlišovaných na excitační a emisní. Monochromátor je zařízení nabízející oproti filtrům kromě možnosti uzpůsobení výběru prostupující vlnové délky i podstatně vyšší účinnosti, co se množství propouštěných fotonů týče. [3-5,8,16,25]

Asi nejjednodušším typem monochromátoru je jednoduchý *hranolový* monochromátor. [3-5,8,16] Tento typ konstrukce s sebou nese, zvláště v krátkovlnné oblasti elektromagnetického spektra, vysoké nároky na instrumentaci a není proto příliš

upřednostňovaný. [3,4,16] Navíc v případě skleněných hranolů dochází v UV oblasti k absorpci a je tedy pro tyto vlnové délky nepoužitelný. [3,4]

K disperzi, tedy k rozkladu záření na jednotlivé složky o různých vlnových délkách, může být využito **mřížky**. Jedná se o lesklou destičku s vysokým počtem jemných hustě rozmístěných paralelně uspořádaných vrypů (na 1 mm až 2 000 vrypů [3]), na nichž v určitých směrech dochází k zesílení záření, zatímco pod ostatními úhly naopak k jeho výraznému zeslabení vlivem difrakce. V závislosti na směru dopadu záření vůči pozici vrypů je záření buďto odraženo, nebo mřížkou prochází a k rozkladu dochází na jejím konci, čehož se ale v praxi nepoužívá. Mřížka může nabývat podoby roviny, nebo být konkávní, kdy už nevyžaduje další optiku pro fokusaci. [3-5,26]

Jeden z nejznámějších a nejrozšířenějších typů je tzv. *Echelle* (Schéma VI), při němž je mřížka tvořena zkosenými širokými plošinami, na nichž dochází k difrakci a úzkými strmými plochami, které nejsou záření vystaveny. [3-5] Lze využít uspořádání, u něž je využito dvojice konkávních zrcadel. To umožňuje, aby při výběru vlnové délky stačilo natáčet mřížkou a zbytek sestavy zůstal statický. Takovýto typ monochromátoru, jehož přiblížení lze vidět na schématu (Schéma VI), nese název **Czerny-Turner**. [3-5,26]

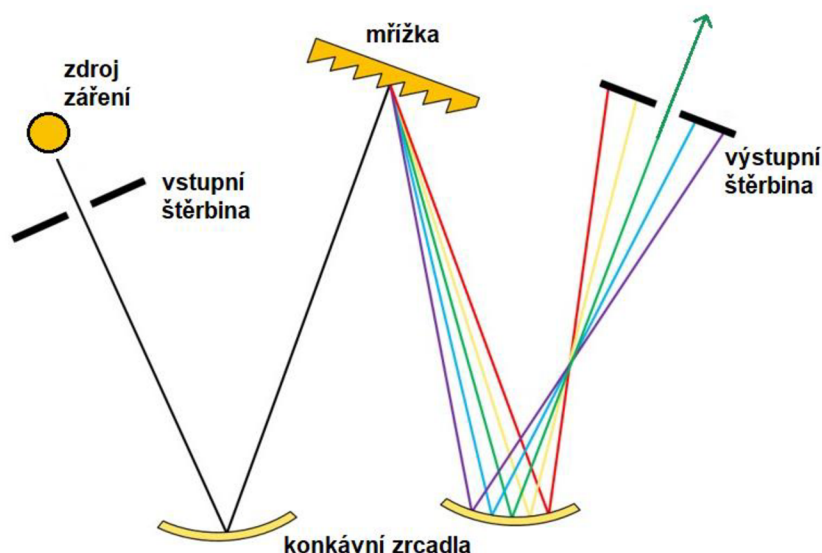


Schéma VI monochromátor typu Czerny-Turner [27]

Dalším příkladem mřížkového monochromátoru může být typ *Echelle*, jenž používá mřížky k rozkladu na druhé mřížce již dříve rozloženého záření. Nabízí tak podstatně širší možnosti při výběru konkrétních vlnových délek. [3-5]

Podmínku pro to, aby došlo ke sjednocení (konstruktivní interferenci) vln odražených z různých míst difrakční mřížky, vyjadřuje tzv. *rovnice mřížky* (10). Podle této rovnice dochází ke sjednocení paprsků pocházejících z míst o vzájemné vzdálenosti  $d$  pouze pro celočíselné násobky  $n$  striktně definovaných vlnových délek  $\lambda$ . Odraz může být rovněž očekáván pouze pro určité úhly dopadu  $\alpha$  a úhly odrazu  $\beta$ . [3-5,26]

$$n \cdot \lambda = d \cdot (\sin \alpha - \sin \beta) \quad (10)$$

*Rozlišení monochromátoru*  $R$  popisuje jeho schopnost rozpoznávat mezi sousedícími vlnovými délkami. Lze vypočítat jako poměr vlnové délky  $\lambda$  a rozdílu dvojice vybraných délek  $\Delta\lambda$ , jak zachycuje rovnice (11). Jedná o bezrozměrnou veličinu. U běžných UV/VIS monochromátorů lze rozlišení očekávat rámcově od  $10^3$  do  $10^4$ . [3-5]

$$R = \frac{\lambda}{\Delta\lambda} \quad (11)$$

### 2.2.3 KYVETY

Kyvety mohou být z různých materiálů, jejichž použití se odvíjí od rozsahu vlnových délek, v němž záření propouští. V UV/VIS oblasti to jsou plastové, skleněné, kyvety z aluminu (oxidu hlinitého) a křemenné, přičemž poslední řečená zasahuje v UV oblasti nejhluběji. [3,5,28,29] Ačkoliv je křemenný materiál v současné době pro UV oblast nejvhodnější, co se do přesnosti měření týče, existují speciální plastové kyvety, které jsou levnější a jež je možno používat do vlnové délky 230 nm, aniž by byla pozorována výrazná změna oproti křemenu [30] jak bylo ostatně ověřeno v praktické části této práce.

Nejběžnější vyráběná podoba kyvet pro fluorimetrické studium UV/VIS oblasti elektromagnetického záření, je tvaru kvádrů a průměru 1 cm, přičemž se usiluje o to, aby byly stěny kyvety ideálně co nejužší, ačkoliv možné je také kupříkladu cylindrické provedení. [3] Kyvety je nutno vhodně udržovat a správně s nimi zacházet, neboť jestliže jejich stěny nejsou dostatečně čisté (mají na sobě uchycenou částici prachu, otisk prstu, apod.), výsledek měření bývá tímto zdatelně ovlivněn.



## 2.2.4 DETEKTORY

Poté, co je monochromátorem vybrán interval vzorkem emitovaného elektromagnetického záření, putuje do zařízení zvaného *detektor*. Jeho účelem je registrovat přítomnost a pokud možno i počet částic záření, na základě kterýchžto informací je následně počítačem vypracována (alespoň částečná) představa o složení vzorku. Ačkoliv je možno proces stanovení stavět na několika principech, je signál v konečném důsledku téměř vždy (historicky byla používána např. fotografická detekce) převeden na elektrický proud (příp. napětí). [4,5,8,10,16]

**Fotonka** je detektor založený na principu *vnějšího fotoelektrického jevu*, při němž dochází k emisi elektronů z jejich stálých orbitalů po dodání kvanta energie fotonem. Jedná se o evakuovanou nádobku obsahující dvojici elektrod (katoda, anoda). Přejedem elektronu z katody na anodu dochází ke vzniku elektrického proudu. [4,5,16]

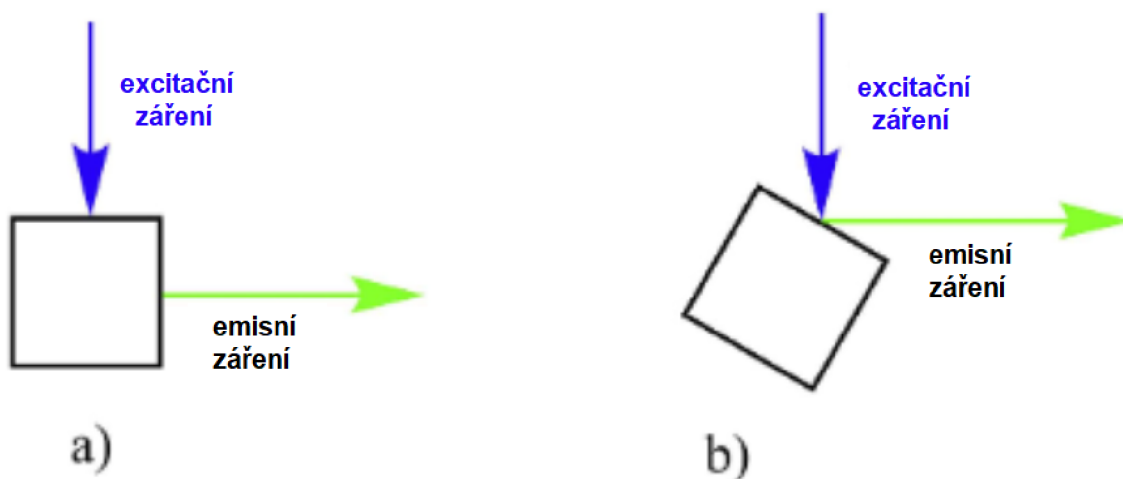
Na vnějším fotoelektrickém jevu je založen rovněž **fotonásobič**, popřípadě jinými slovy **PMT** (z angličtiny: *photomultiplier tube*). Tento detektor obsahuje podstatně vyšší počet elektrod než fotonka. Po dopadu fotonu je z katody uvolněn elektron, který putuje na první z mnoha za sebou následujících dynod. Každá z dynod má větší kladný potenciál než ta předchozí. [4,5,8,16] Dopad jediného elektronu u každé vyvolá emisi několika dalších, a to až patnáctkrát [5] než částice dospějí k anodě, pročež dochází k výraznému zesílení signálu řádově i více než milionkrát. [4,5,16] Je tedy nesmírně vhodný pro vzorky o stopových množstvích analytu a tedy i fluorimetrická stanovení.

Dalším typem detektorů hojně využívaným při fluorescenční spektrometrii jsou **křemíkové polovodičové fotodiody**. Ty na rozdíl od předešlých detektorů podstupují *vnitřní fotoelektrický jev*, během něhož uvolněné elektrony látku neopouští a zůstávají v ní jako vodivostní elektrony. S dopadem na diodu dochází na polovodičovém přechodu p-n ke vzniku elektrického proudu nebo napětí vlivem pohybu entit (kladně nabitého místa postrádajícího elektron a volného elektronu). [4,5,8,16]

## 2.2.5 ANALÝZA PEVNÝCH VZORKŮ

Přestože je fluorescenční spektrometrie užíváno především u vzorků kapalného skupenství, je možno se setkat s případy, kdy jsou analýze podrobeny plynné, či pevné vzorky. Jenže zatímco pro plyny (ať už plynné vzorky, nebo plyny uvolňované ze vzorku jiného skupenství) je možné použít týchž aparatur z analýzy kapalin (navíc pouze opatřených víkem, případně u průtokových cel beze změny) [3], pevné látky mnohdy vyžadují speciálních držáků [31,32], nebo optických kabelů [25], ačkoliv těch se využívá i v případech kapalných vzorků [33].

Neboť je většina pevných vzorků elektromagnetickému záření v používaném rozsahu neprostupná, využívá se zkosené geometrie označované jako FF (z angličtiny: *front face*), zachycené na obrázku (Obr. 2), při níž je pozorováno emisní záření vzniklé pouze na povrchu vzorku. [3,5,25] Nepříjemnou potíží je však silnější podíl chyby signálu vzniklého odrazem paprsků – o řešení tohoto problému se starají zmiňované speciální držáky kontrolou úhlu, pod nímž k dopadu dochází. Emisní záření se stále pozoruje pod pravým úhlem od záření dopadajícího, ale mění se úhel, pod nímž záření na vzorek dopadá. [32]



Obrázek 2 ukázka geometrie a) pravouhlé pro kapalně vzorky, b) FF geometrie pro pevné a silně koncentrované kapalně vzorky [25]

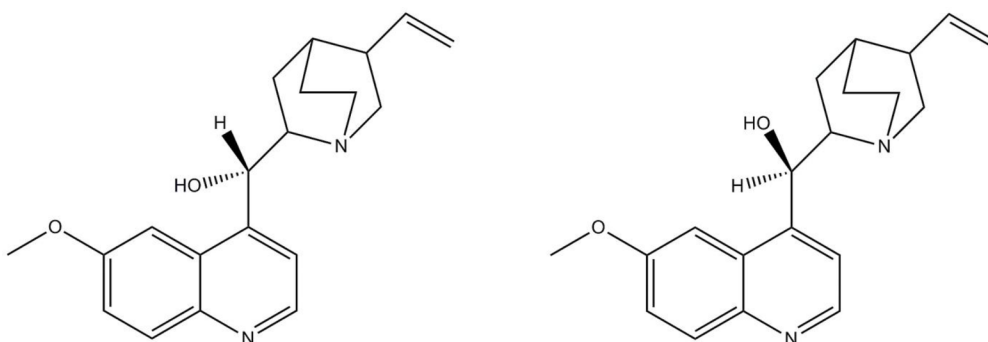
## 2.3 CHININ

### 2.3.1 CHEMICKO-FYZIKÁLNÍ SPECIFIKA

Chinin spadá mezi jeden z mnoha heterocyklických derivátů alkaloidů, jež je možno v přírodě nalézt v kůře chinovníku, rostlině z čeledi Mořenovité (*Rubiaceae*). [34-41] Obsah aktivní látky nicméně nezávisí výlučně pouze na rostlině, jež byla k jeho získání použita. Její procentuální zastoupení může záviset na mnoha faktorech, a to ať už na stáří sklizeného stromu, místě, v němž vyrostl, či pouze rozdílnou částí téhož stromu, z něhož byla kůra odebrána. [34,37,39,40,42,43]

Neboť se jedná o dusík obsahující alkaloid, nepřekvapí jeho alkalické vlastnosti. Vzhledem k tomu je tato látka často prezentována v podobě své soli, jmenovitě: hydrochloridu, síranu, bisíranu, glukonátu a nejčastěji dihydrochloridu. [44]

Empirický vzorec této látky je  $C_{20}H_{24}N_2O_2$ . Systematicky je jí možné popsat jako (R)-[(2S,4S,5R)-5-ethenyl-1-azabicyklo[2.2.2]oktan-2-yl](6-methoxychinolin-4-yl)-methanol. Chinin tedy ve své struktuře obsahuje kromě vinylové a methoxy- skupiny také hydroxyl tvořící na devátém uhlíku molekulového skeletu stereogenní centrum, jež jej svou prostorovou orientací odlišuje od svého (S)-izomeru chinidinu, který se ze sterických důvodů vyskytuje rovněž s inverzí isomerie na osmém uhlíku. Struktura těchto dvou látek je vyobrazená na obrázku (Obr. 3). [41,45] Relativní molekulová hmotnost této látky je  $324,42 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Je rozpustný ve vodě a polárních rozpouštědlech.



Obrázek 3 chemické struktury chinidinu (vlevo) a chininu (vpravo)

Chinin absorbuje elektromagnetické záření v UV oblasti, což se děje nejvíce ve dvou maximech: 250 nm a 350 nm. Světlo, jež fluorescencí emituje zpět, se pak již nachází

ve viditelné oblasti spektra a nejvyšší intenzity dosahuje při vlnové délce 450 nm, kterou lidské oko vnímá jako modrou barvu. [46,47] Často se proto používá jako standard ve fluorescenční spektrometrii. [3,4]

## **2.3.2 HISTORICKÝ KONTEXT**

### **2.3.2.1 KOLONIÁLNÍ ÉRA**

Přestože byly léčivé účinky kmene chinovníku známy dávno před příchodem Španělů do Ameriky domorodými Kečuánci, Caňari a příslušníky Chimů z oblasti rozléhající se v rámci hranic dnešního Peru, Bolívie a Ekvádoru, první dokumentace jeho moci účinně bojovat proti projevům malárie, tedy vysokým horečkám doprovázených silnými zimnicemi, pochází z období kolem roku 1630, kdy jeho lékařský význam zaregistrovali jezuitští kněží. [34-40,48-50]

Podle legendy získala rostlina svůj název podle hraběnky z Chinchonu, manželky vicekrále Peru, kterou během její návštěvy postihly příznaky malárie, pročež jí vicekrál nechal podat nápoj z léčivého stromu z hor, o jehož přípravu se postarali Jezuité. Hraběčin stav se po požití přípravku výrazně zlepšil a s jejím vyléčením bylo této květině přisouzeno jméno chinovník, které mělo odrážet původ hraběnky a s ní i tento příběh. [34,36,39,40,48,50]

Ačkoliv byla pravdivost příběhu již dávno vyvrácena a název květiny byl patrně odvozen od názvu užívaného domorodci, tj. „quina-quina“ neboli „kmen kmenů“, [39,50,51] pravdou zůstává, že se bílý „Jezuitský prášek“, jak mu bylo mimo mnohé další názvy přezdíváno, vzniklý nadrcením kmene chinovníku, stal po následující tři století [34] jedinou efektivní obranou před malárií, což stálo za jeho hojným vývozem do Evropy, která měla tou dobou a v průběhu nadcházejících dekád problémy se zdravím svých vojenských posádek udržujících nadvládu nad malárií zamořenými koloniemi. [38,50] Jednotlivé státy se tak nad pěstitelstvím chinovníků snažily získat monopol.

Až po přibližně 200 letech pravidelného vývozu chinovníků z Jižní Ameriky začali Evropané projevovat zájem o kultivaci chinovníků na územích svých malárií zamořených kolonií, kde by měl z nich vyráběný lék nejen snazší přístup k místnímu obyvatelstvu a vojenské posádce udržující nadvládu nad místním obyvatelstvem, ale odkud by jej mohli

rozvázat zbytku Evropy a zajistit si tak s touto strategickou surovinou postavení nezávislé na Španělském království, státě s dosud bezkonkurenčním monopolem na vývoz kůry. [38] Předně to byli Angličané, Francouzi a Nizozemci, jejichž ambice spravovat vlastní pěstírny chinovníků vyústily v pokusy o ukořistění těchto rostlin z rukou Španělska a jejich převoz, případně jejich semen, na nová území: Indie a Cejlonu (dnešní Srí Lanku) v případě Anglie, či Nizozemské východní Indii (dnešní Indonésie, především Jávě). [34,48,50]

Jejich pěstitelství s sebou však neslo značný počet problémů. Během počátečních převozů semen přes oceán mnohdy většina sazenic nepřežila cestu, a pokud ano, jen velice obtížně si zvykaly na novou půdu, do níž byly vsazeny. [34,39,48] Úspěchu se po mnoha zmařených pokusech dočkali Nizozemci, jimž se s pomocí Charlese Ledgera [38,39,48,50] (Angličana žijícího v Peru, podle něhož nese jméno i jedna z chinovníkových odrůd *Cihona ledgeriana*) podařilo ukořistit něco málo přes 6 kg semen, která během svého pobytu v Peru sesbíral a následně přes hranice propašoval. [34,38,42,52]

### 2.3.2.2 VÁLEČNÉ OBDOBÍ

Během světových válek došlo ke tvorbě blokad obchodních cest mezi nizozemskými koloniemi, které produkovaly většinu světové zásoby chininu, a Německem, na jehož území se naopak vyskytovala většina továren zpracovávající kořeny chinovníků do podoby tabletek sulfátové soli a bylo odtud (ve spojení s Amsterdamem) uzavíráno nejvíce obchodů s léčivem souvisejícím. To značně ochromilo schopnost produkce antimalarik, která byla zvláště po skončení války a s tím souvisejícím zanesením malárie do oblastí, v nichž se nemoc dříve běžně nevyskytovala, o to více potřebná, protože poptávka po léku rapidně vzrostla. [38]

Během druhé světové války, kdy obsazení Indonésie Japonci a amsterdamských skladů chininových tablet Němci působilo na spojence výrazným tlakem, započala snaha zajistit si přísun antimalarik odjinud. [34,38,40,48,53] Ačkoliv jedním z řešení bylo přesunutí chinovníkové produkce za pomoci semen používaných v Indii zpět do Střední Ameriky, zájem o alternativní způsoby obrany proti nemoci již zažehla minulá válka a tato starou snahu jen více utvrdila. Náhrada se hledala jak snahou o kompletní syntézu chininu laboratorní cestou, tak i pátráním po zcela jiných potenciálních syntetizovatelných antimalaricích. [34,38,40,48] V současnosti se mimo výroby léčiv chinin používá i pro přípravu toniků. (54)

### 2.3.2.3 TONIK

V době velikých pokroků na poli chemie, mezi něž patřil kupříkladu objev oxidu uhličitého (roku 1755 Josephem Blackem), Joseph Priestley, renesanční člověk, který sám o chemii projevoval hluboký zájem, fascinovaný nově objevenými plyny, experimentoval s oxidem uhličitým vyvěrajícím z kvasných kádí pivovaru, v němž tou dobou pracoval. Voda vzniklá ponecháním v kádí přes noc měla „*velmi rozumnou a příjemnou impregnaci*“. [50, str. 68] Toto odhalení vedlo k nástupu sycených nápojů na trh.

Ačkoliv bylo označení tonik svého času používáno pro nespécifický posilující léčebný přípravek, v dnešních dnech je toto slovo chápáno jako perlivý nealkoholický nápoj obsahujícím chinin. Za jeho popularizaci, jakožto i mnohých dalších perlivých nápojů, se zasloužil Jacob J. Schweppe. [50] Neboť má chinin ve vyšších množstvích až nepříjemnou hořkou příchut', byl častokrát podáván spolu s alkoholem jako motivace, čehož se využívalo i u pacientů léčených z malárie. [39,48,50] Dnešní toniky však už taková množství použitelná pro léčbu neobsahují.

### 2.3.3 SYNTÉZA

První ohlášenou laboratorní syntézou chininu byla *Woodward-Doeringova* syntéza roku 1945 [55], ačkoliv ta stála na dosud v praxi neověřených postupech *Rabeho* a *Prelogovy* syntézy [56-58] a nebyla dostatečně stereoselektivní [55-57], což působilo po mnoho let jistou kontroverzi, a to i přes to, že byla proveditelnost metody roku 2008 potvrzena, [59]

Dostatečnou stereoselektivitu poskytla *Storkova* syntéza, při níž se *Stork* částečně inspiroval *Uskokovičovou* autooxidací deoxychininu. Tento postup bral totiž na rozdíl od svých předchůdců v potaz vinylovou skupinu na uhlíku C3, která při *Rabeho* syntéze skrze C8 svou přítomností způsobovala tvorbu přibližně rovného množství nežádoucích enantiomerů. *Stork* se proto rozhodl této skupiny zbavit jejím přesunutím na okraj, kde už byla od stereocentra příliš daleko na to, aby mohla izomerii nově tvořících se molekul jakkoliv výrazně ovlivnit. Rovněž usoudil, že vhodná asymetrie na uhlíku C8 bude snáze dosažitelná skrze piperidin, než bicyklický chinuklidin, který je možno vytvořit až v posledních krocích připojením uhlíku C6 k dusíku, jak je ukázáno na schématu (Schéma VII). [39,57]

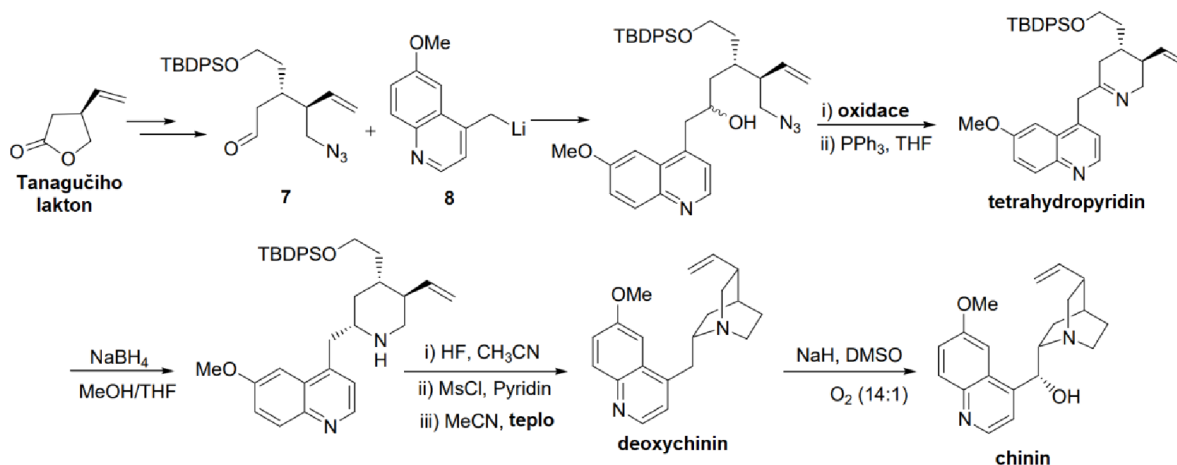


Schéma VII Postup Storkovy syntézy chininu

Původní Rabeho strategii, která k vytvoření bicyklu využívala vazby C8-N, se dostalo opětovné pozornosti v roce 2003 na Harvardově univerzitě, když se Eric. N. Jacobsen se svým týmem rozhodli vypořádat s jejími nedostatky využitím intramolekulární amino-epoxidové cyklizace, jež se zasloužila o vhodné prostorové uspořádání na C4 (a tedy v důsledku i na C8) [60,61] V závislosti na užívaném katalyzátoru během procesu dihydroxilace, během níž dochází k převodu alkenu na vicinální diol, tato nová metoda umožňovala stereoselektivně vybrat finální produkt, a to buďto chininu, nebo chinidinu. Ten byl získán uvolněním ochranné skupiny na atomu dusíku vzniklého epoxidu a následným vystavením ultrazvuku. [39,57]

I přes veškeré pokroky laboratorní syntézy zůstává tato cesta pro běžné a spolehlivé získávání této látky upozaděna za extrakcí z přírodních zdrojů, přestože v laboratořích může být syntetizována v poměrně vysoké čistotě (současně nejvyšší dosažená míra výtěžku chininu je 73 % [62]). Odpovědí na otázku proč, jak už tomu nejčastěji bývá, je ekonomická stránka věci. [53]

## 2.3.4 CHININ A ZDRAVÍ

### 2.3.4.1 MALÁRIE

Malárie je onemocnění typické napříč tropy a subtropy, jehož jméno je odvozeno od latinského výrazu pro „špatný vzduch“, *mal'aria*. [48,50] Ve skutečnosti je ale způsobované parazitickými prvky rodu *Plasmodium* – zimničkami. Ty do lidského těla vstupují prostřednictvím samičích zástupkyň komárů, a to výhradně rodu *Anopheles*, jejichž cílem je použití odsávané krve jako potravy pro jejich vajíčka. Před výměnou hostitele, k čemuž dochází po penetraci pokožky, kdy trubice ústního ústrojí proniká do krevního oběhu, parazité přebývají v jeho slinných žlázách. V krvi parazit vstupuje do červených krvinek, kde se živí na jejich proteinech, což má za důsledek jejich zničení. Příznakem malárie je tedy jednoznačně chudokrevnost, dále horečky, u nichž se mohou rozvinout typické cykly horečky, silného pocení a pocitů zimnice, odvíjejících se od životního cyklu zimničky. Dále se dostávají bolesti hlavy a kloubů, křeče, nebo zvracení. V nejhroších případech dochází k úmrtí. Například v případě malárie šířené *Plasmodii falciparum* (Zimničkou tropickou) může dojít i u neobyčejně zdravých jedinců k náhlé smrti způsobené četnými krevními sraženinami v mozku. [39,50,63,64]

Jako samostatná nemoc byla malárie klasifikována během druhé poloviny 18. století, přestože na planetě s lidstvem přebývala stovky, ne-li přímo tisíce let. Důvodem byl problém rozlišení mezi horečkami vzniklými malárií a těmi jiného původu, což ostatně zůstává problémem do dnešního dne, kdy mechanismus, jakým horečky působí, stále nebyl zcela odhalen. [37]

Podle odhadů WHO (World Health Organization) mělo onemocnění v roce 2021 celosvětově za následek okolo 247 milionů případů, z čehož je odhadováno, že okolo 619 000 z nich skončilo úmrtím. Valná většina těchto případů (96 %) náleží africkému regionu, zejména jižně od Saharské pouště, a 80 % dětem mladším 5 let. [64]

Jak již bylo nesčetněkrát psáno výše, chinin je schopen se vypořádat s parazity v lidském těle, avšak vyléčený pacient mnohdy po značnou chvíli zůstává chudokrevný, apatický a obecně vyčerpaný. V některých případech se může nemoc také nečekaně vrátit po několika týdnech až letech, neboť zimničky dokáží po tento čas přečkat v játrech, aniž by v těle vzbudily jakýkoli rozruch. [39,65] Nicméně v případě řečené *P. falciparum* byla pozorována rezistence vůči přípravkům na bázi chininu, tudíž by bylo nemoudré



chinin považovat za univerzální všelék. [39,48] I přesto je ale tato látka v boji proti malárii stále hojně využívaná, a to zvláště v případech, kdy jiná léčiva u pacientů nezabírají.

#### 2.3.4.2 TOXICITA

Mimo léčbu malárie, díky níž se chinin ve zdravotnictví proslavil bezesporu nejvíce, využití našel rovněž při léčbě křečovitých stahů [40,49,66-70], jako anestetikum, antiseptikum, nebo dokonce jako forma antikoncepce či metoda pro dosažení snazšího průběhu porodu. Jak se ale říká: „dávka dělá jed,“ a vzhledem k vysoké potenciální toxicitě, přestože podstatně menší, než v případě svého isomeru chinidinu, není překvapivé, že se od užívání chininu v těchto případech ustupuje ve prospěch jiných forem léčby, pokud jsou k dispozici. [40,49,66-70]

Nejčastěji tak k vystavení nebezpečnému množství dochází během pokusů o sebevraždu předávkováním, nebo při požití drog, zejména heroinu, do nichž byl chinin přidán jako nežádoucí příměs (podobně, jako tomu bylo s kůrami chinovníků před příchodem chininových tabletek [34]), nejčastěji ve formě síranů nebo hydrochloridů. Při intravenózním podání pak takováto směs vysoce pravděpodobně způsobuje křeče, kóma nebo smrt. Dalším častým zdrojem předávkování je mylná představa, že se chininu dá spolehlivě využít pro vyvolání interrupce, kdy počáteční dávka nezabírá, a tak dochází k jejímu zvyšování, dokud není dosaženo toxických hladin a otravě. Přesto by ale neměl být konzumován těhotnými ženami. [49,66-70]

Onemocnění, které je způsobeno přílišným požitím chininu a jeho derivátů, nese pojmenování *cinchonismus*. Mezi jedny z prvních příznaků patří nevolnost následovaná zvracením, bolestmi břicha a průjmem. Běžné jsou rovněž bolesti hlavy, ataxie a závratě, bradykardie a arytmie a silné pocení. Nemálo častý je také tinnitus neboli zvonění v uších. Při vyšších dávkách může dojít rovněž ke ztrátě sluchu, zraku a případně také života. [44,49,66-71]

Symptomů této nemoci se člověk dočká zpravidla při požití více než 4 g léku, což vzhledem k tomu, že obsah chininsulfátu v kapslích a tabletách se pohybuje v rozmezí 130-325 mg, odpovídá přibližně 12-30 kusům. K úmrtím v důsledku selhání ledvin docházelo již při množstvích kolem 8 g v případě dospělých jedinců, v případě dětí

pak stačí jen 1 g. [49,69,71] Přesto byly hlášeny případy, kdy byl organismus vystaven anafylaktickému šoku po zkonsumování i velmi malých množství. [66,70,72]

Chinin je ve střevech téměř okamžitě vstřebán; nejvyšších hodnot jeho koncentrace v krevní plasmě dosahuje během 1 až 3 hodin od požití. [44,71] První potíže se zrakem se dostavují s překročením hladiny  $10 \text{ mg.l}^{-1}$  krevní plasmy, avšak tato poškození nemusí být nutně trvalá. Hladiny přesahující hodnotu  $16 \text{ mg.l}^{-1}$  bývají spojeny s kardiální toxicitou. [49,71,73]

### 2.3.4.3 LEGISLATIVA

Vzhledem k nebezpečí, které biologická aktivita chininu pro člověka představuje, není s podivem, že v rámci jeho použití v potravinářském průmyslu došlo ve většině zemí k zákonnému stanovení maximálního přípustného množství této látky ke konzumaci. Ve Spojených státech amerických je chinin jakožto hydrochloridová nebo sulfátová sůl v sycených nápojích povolen do výše 83 ppm (tj. přibližně  $83 \text{ mg.l}^{-1}$ ). [74,75] Ovšem toto omezení platí rovněž pro celkové množství alkaloidů v chinovníkové kůře, jež se sama používá pro výrobu některých nápojů. [76]

V Evropě otázku diskutoval Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA). Ve své zprávě výbor uvádí: „*Současná úroveň použití do 100 mg/l (jako chininová báze) v nealkoholických nápojích nepředstavuje toxikologické riziko. Příspěvek ostatních použití chininu v potravinách a alkoholických nápojích k dennímu příjmu byl považován za zanedbatelný.*“ [77, str. 9] Ovšem stále se zabývá potřebou řádného značení produktu pro potřeby osob na látku citlivých.

Konečně v Česku se hraniční hodnotou množství chininu v potravinách zabývá vyhláška č. 447/2004 Sb., která u nealkoholických nápojů na bázi vody a alkoholických nápojů s výjimkou piva, vína a lihovin povoluje nejvýše  $75 \text{ mg.l}^{-1}$ , v případě lihovin pak  $300 \text{ mg.l}^{-1}$ . [78]

### 2.3.5 VYBRANÉ PŘÍPADY STANOVENÍ CHININU

Chinin může být stanovován různými analytickými metodami, přestože mnoho z nich při detekci používá právě spektrálních vlastností této látky. K potřebě stanovení dochází především kvůli silné biologické aktivitě chininu, a tak k němu dochází především u vzorků potravin a nápojů [75,79-81], případně u léčebných přípravků či během lékařských prohlídek. [54,81] K jeho stanovení dochází i ve vzorcích kůry chinovníku. [82] Dále pak bývá častokrát používán jako vnější standard v metodách UV/VIS spektrometrie. [3,4] Přehled metod použitých ke stanovení chininu v uvedených vzorcích je uveden v tabulce (Tab. I).

Vybranými metodami jsou kapilární izotachofóza *CITP* (z anglického: *capillary isotachopheresis*) [81], iontová párová chromatografie na reverzní fázi *RP-IPC* (z angličtiny: *reversed phase ion pair chromatography*) [75], vysokoúčinná kapalinová chromatografie *HPLC* (z angličtiny: *high performance liquid chromatography*) bez [79] a s modifikací zónové fluidiky *ZF-HPLC* [80], plynové chromatografie *GC* (z angličtiny: *gass chromatography*) [54] a voltametrií čtvercových vln *SWV* (z anglického: *square wave voltametry*), příp. diferenční pulzní voltametrií *DPV* (z anglického: *differential pulse voltametry*). [82]

Tabulka I vybraná stanovení chininu v nápojích, moči, kůře a léčivech

separační metoda	forma detekce	LOD [ $\mu\text{g.l}^{-1}$ ]	LOQ [ $\mu\text{g.l}^{-1}$ ]	vzorek/ky
CITP	UV absorpce	5 000	-	nápoje, farmaceutické přípravky, moč
RP-IPC	UV spektrometrie	20	-	nápoje
	fluorimetrie	4	-	
HPLC	LIF	0,64	1	nápoje
ZF-HPCL	UV/VIS spektrometrie	250	800	nápoje
GC	MS	1 000	-	moč
extrakce	SWV	0,132	0,441	nápoje, kůra chinovníku
	DPV	0,238	0,793	

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 ANALYZOVANÉ VZORKY

Pro podstoupení analýzy bylo vybráno celkem 12 chinin obsahujících vzorků dostupných v běžných obchodních řetězcích s potravinami. Tabulka (Tab. II) uvádí jejich přehled. 11 z těchto vzorků vybraných pro analýzu byly toniky různých druhů a výrobců, zbylý (vzorek VI) byl pak náplní pro domácí sodovou vodu SodaStream. Obsah chininu na etiketách vzorků nebyl uveden.

Tabulka II Přehled vzorků analyzovaných v bakalářské práci

vzorek	komerční název	výrobce	číslo šarže
I	Kinley London Style Tonic Water	Coca-Cola HBC Česko a Slovensko, s.r.o., Česká republika	L 21.09.22XG23:15
II	Schweppes Indian Tonic	Mattoni 1873 a.s., Česká republika	C30012216
III	Schweppes Bitter Lemon	Mattoni 1873 a.s., Česká republika	C02030412
IV	Schweppes Pink Tonic	Mattoni 1873 a.s., Česká republika	C31010339
V	River Indian Tonic Water	MASPEX Czech s.r.o., Česká republika	L2112141ZP T
VI	SodaStream Tonik	SodaStream Industries Ltd., Izrael	LOT 47081
VII	Kinley Pink Aromatic Berry	Coca-Cola HBC Česko a Slovensko, s.r.o., Česká republika	L 16.02.23XG04:08
VIII	Kinley Stockholm style Bitter Lemon	Coca-Cola HBC Česko a Slovensko, s.r.o., Česká republika	L 27.11.22XG20:19
IX	Kinley London style Ginger Ale	Coca-Cola HBC Česko a Slovensko, s.r.o., Česká republika	L 16.02.23XG08:23
X	Original Tonic Water	Lidl Stiftung & Co. KG, Německo	L2336:113:04
XI	Fever-Tree Premium Indian Tonic Water	Fever-Tree, Německo	L22277K303_BE
XII	THOMAS HENRY Cherry Blossom Tonic	Thomas Henry GmbH & Co. KG, Německo	L 2212508

#### 3.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

K přípravě standardních roztoků chininu byl použit chinin bezvodý (*SIGMA-ALDRICH*,  $\geq 98\%$ , Německo) a zředěná kyselina sírová (*PENTA s.r.o.*, 96% p.a., Česko). K rozpouštění a ředění byla rovněž použita demineralizovaná voda.

#### 3.3 INSTRUMENTACE A EXPERIMENTÁLNÍ PODMÍNKY

Při přípravě matrice byl použit stolní pH-metr inoLab® 7110 (*Německo*) s kombinovanou skleněnou elektrodou (*WTW, Německo*). Elektroda byla před měřením seřizena dvoubodovou kalibrací na standardní tlumící roztoky o pH = 4,00 a 7,00.

Při proměrování absorpčních spekter bylo využito spektrofotometru Jasco modelu V-770 (*Jasco ABLE, Japonsko*). Pro tvorbu kalibrační křivky a posléze kvantitativní analýzu a „spikování“ analýza probíhala na spektrofluorimetru Jasco FP-8300 (*Jasco ABLE, Japonsko*).

Bližší specifika, při nichž byly přístroje používány, jsou uvedeny v tabulkách (Tab. III, IV). Rovněž bylo provedeno proměření excitačního a emisního spektra standardu chininu za nastavení podmínek odpovídajícímu obsahu tabulky (Tab. V). Při měření bylo používáno různých nastavení citlivosti, která jsou pro jednotlivá měření uvedena v tabulkách (Tab. VI).

**Tabulka III Parametry spektrometrických měření na přístroji Jasco V-770**

PARAMETRY	
fotometrický mód	absorpce
délka pásma (bandwidth)	2 nm
rychlost skenování	400 nm/min
start	800 nm
konec	200 nm
datový interval	1 nm
kyveta	plast

**Tabulka IV Parametry spektrofluorimetrických stanovení na přístroji Jasco FP-8300 (informace o příslušenství viz (Tab. VI))**

PARAMETRY	
excitační vlnová délka	350 nm
emisní vlnová délka	450 nm
excitační délka pásma	5 nm
emisní délka pásma	5 nm
rychlost skenování	100 nm/min
shutter excitační	otevřený
shutter emisní	otevřený

**Tabulka V Parametry spektrofluorimetru během měření excitačního a emisního spektra standardu chininu**

PARAMETRY							
<b>EXCITAČNÍ SPEKTRUM</b>		kyveta	plast	shutter excitační	otevřený	excitační filtr	ne
emisní vlnová délka	450 nm	start	230 nm	shutter emisní	otevřený	emisní filtr	ne
excitační délka pásma	5 nm	konec	440 nm	citlivost	nízká		
emisní délka pásma	5 nm	datový interval	1 nm	rychlost skenování	100 nm/min		
<b>EMISNÍ SPEKTRUM</b>		kyveta	plast	shutter excitační	otevřený	excitační filtr	ne
excitační vlnová délka	350 nm	start	370 nm	shutter emisní	otevřený	emisní filtr	ne
excitační délka pásma	5 nm	konec	600 nm	citlivost	nízká		
emisní délka pásma	5 nm	datový interval	1 nm	rychlost skenování	100 nm/min		

Během práce na spektrofluorimetru byly využity plastové kyvety UV-Cuvette (*Brand GMBH + CO KG, Německo*), křemenná kyveta (*RMI s.r.o., Česko*), během práce na spektrofotometru byly vzorky umístovány do plastových kyvet (*Brand GMBH + CO KG, Německo*). Optické délky všech těchto kyvet byly 10 mm.

Upotřebeny byly rovněž dva atenuátory, neboli filtry, či deskové tlumiče záření, (*Jasco ABLE, Japonsko*), přičemž *filtr A* (FA) zeslabuje procházející záření o 14 %, *filtr B* (FB) o 98 % [83]. Typ pro měření použitých kyvet i atenuátorů je uváděn v tabulkách (Tab. VI).

Tabulka VI Přehled nastavení citlivosti, použitých filtrů a kyvet při spektrofluorimetrických měřeních 1-4

CITLIVOST A PŘÍSLUŠENSTVÍ					
měření	citlivost	excitační filtr	emisní filtr	kyveta	
1	a	střední	ne	ne	křemen
	b	střední	ne	ne	plast
2	a	střední	ne	ne	plast
	b	nízká	ne	FB	plast
	c	střední	ne	FB	plast
	d	střední	ne	FA	plast
3	nízká	ne	FB	plast	
4	nízká	ne	ne	plast	

### 3.4 POSTUP MĚŘENÍ

#### 3.4.1 STANOVENÍ OPTIMÁLNÍHO pH

Pro výběr optimálního pH bylo podle postupu z pracovního návodu [10] využito sedmi 25ml odměrných baněk obsahujících roztoky chininu o koncentraci  $2,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  s různými hodnotami pH, jichž bylo získáno rozdílným obsahem kyseliny  $\text{H}_2\text{SO}_4$  podle tabulky (Tab. VII). Po provedení nadávkování byl obsah odměrné baňky doplněn destilovanou vodou po rysku.

Tabulka VII Příprava roztoků pro určení optimálního pH matrice

pH (cca)	dávkový objem (ml)*		
	0,25 M $\text{H}_2\text{SO}_4$	0,0125 M $\text{H}_2\text{SO}_4$	0,0005 M $\text{H}_2\text{SO}_4$
1,27	5	-	-
2,12	-	10	-
2,73	-	2	-
3,40	-	-	10
4,10	-	-	2
4,28	-	-	1
6,95	-	-	-

\* dávkované objemy jsou uvedeny na celkový objem 25 ml

Obsahy těchto baněk byly postupně vlitý do vhodně veliké kádinky a pomocí pH-metru byla stanovena jejich kyselost. Roztoky o známých kyselostech pak byly vloženy do plastových kyvet a na spektrofluorimetru podrobena měření za podmínek tabulky (Tab. IV) při střední citlivosti a při excitační vlnové délce 350 nm, přičemž fluorescence byla pozorována při 450 nm.

### 3.4.2 PROMĚŘENÍ SPEKTER

Pro zvolení optimálních vlnových délek k excitaci vzorků a pozorování emise jejich fluorescenčního záření bylo nutno proměřit excitační a emisní spektra. K tomu bylo využito spektrofluorimetru Jasco FP-8300. Po nastavení parametrů uvedených v tabulce (Tab. V) bylo proměřeno nejprve excitační, posléze emisní spektrum.

Rovněž byla proměřena absorpční spektra některých vzorků s ohledem na možnou absorpci záření barvivy v nich obsaženými. Toto se dělo na spektrofotometru Jasco modelu V-770 za podmínek z tabulky (Tab. III). Vzorky byly ředěny, aby se jejich signály dostaly do optimálních hodnot, a to tak, aby jejich výsledná koncentrace kyseliny sírové zůstala stejná jako v ostatních případech, tedy  $5 \text{ mmol.l}^{-1}$ .

### 3.4.3 STANOVENÍ OBSAHU CHININU VE VZORCÍCH

Před každou sérií měření byla provedena kalibrace metodou vnější kalibrace. Postupným ředěním zásobního roztoku chininu vzniklého přesným navážením *přibližně* 6,25 mg do odměrné baňky o objemu 250 ml ( $c = 25 \text{ mg.l}^{-1}$ ) tak byla připravena série kalibračních standardů, jejichž koncentrační rozsah se měnil v závislosti na měření. Pro úpravu pH prostředí byla použita kyselina sírová a to tak, aby její výsledná koncentrace byla  $5 \text{ mmol.l}^{-1}$ .

Analyzované vzorky toniků byly před měřením zbaveny rozpuštěného oxidu uhličitého pomocí ultrazvukové lázně po dobu 15-20 minut podle potřeby. I zde byly vzorky ředěny směsí destilované vody a kyseliny sírové tak, aby výsledná koncentrace kyseliny odpovídala uvedené koncentraci  $5 \text{ mmol.l}^{-1}$ . Měření bylo spouštěno po uplynutí 5 sekund po vložení do přístroje a uzavření jeho víka.

Na závěr stanovení byla prováděna analýza obohacených vzorků ke zjištění výtěžnosti  $R_f$  měření. Po přidavku roztoku chininu o známé koncentraci („spikování“), kdy bylo do odměrných baněk o objemech 25 ml mikropipetou vloženo 2,500 ml vzorku, žádný, 1,000, nebo 2,000 ml standardu (pro tyto účely bylo využito roztoků použitých během kalibrace) a jejich následném proměření.

### 3.4.4 MEZ DETEKCE

Mez detekce byla stanovována na spektrofluorimetrickém přístroji za podmínek uvedených v kapitole 3.3. *Použitá instrumentace a experimentální podmínky*. Došlo k desetinásobnému proměření téhož roztoku blanku (slepého pokusu) a kalibračního roztoku o  $c = 0,01 \text{ mg.l}^{-1}$ .

### 3.5 ZPRACOVÁNÍ DAT

Stanovení koncentrace chininu ve vzorcích metodou fluorescenční spektrometrie bylo provedeno metodou vnější kalibrace a metodou přidavků standardu. Po vnesení hodnot zaznamenaných během tvorby kalibrační závislosti metodou nejmenších čtverců do grafu v tabulkovém softwaru *MS Excel 2007*, byla programem vygenerována lineární spojnice trendu  $y = a \cdot x - b$ . Po dosazení veličin náležejících příslušným osám do této rovnice byla získána závislost

$$I = a \cdot c_{\text{chinin}} - b \quad (12)$$

kde  $I$  značí intenzitu fluorescence a  $c$  hmotnostní koncentrací v  $\text{mg l}^{-1}$  (ppm),  $a$  směrnici lineární závislosti a  $b$  úsek lineární závislosti. V témž programu byla získána i hodnota koeficientu determinace  $R^2$ .

Faktor výtěžnosti pro ověření výtěžnosti stanovení  $R_f$  (v %) byl určován pomocí následujícího vztahu

$$R_f = \frac{c_{sp} - c_{vz}}{c_{ref}} \cdot 100 \quad (13)$$

v němž  $c_{sp}$  značí koncentraci látky v obohaceném „spikovaném“ vzorku,  $c_{vz}$  koncentraci ve vzorku bez dalšího přidavku a  $c_{ref}$  koncentraci chininu v přidavku.

Pro výpočet meze detekce (LOD) byl převzat upravený postup z technického přehledu [84], z něhož byla po úpravě na stanovovanou látku získána rovnice (14).

$$LOD = c_{\text{chinin}} \cdot \frac{3 \cdot \text{směrodatná odchylka}}{\text{čistý signál (vzorek-slepý pokus)}} \quad (14)$$



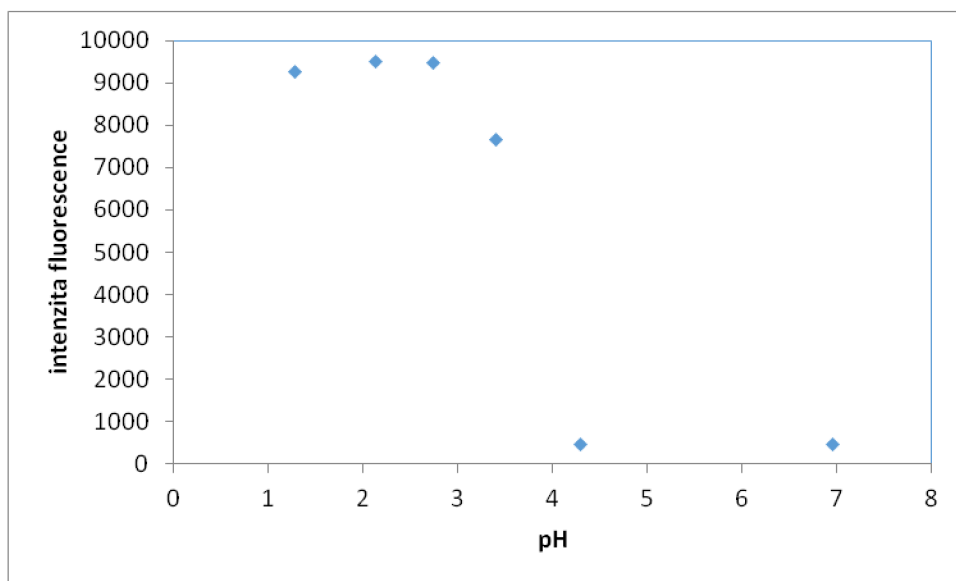
## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 VLIV pH

Podle postupu z kap. 3.4.1. *Stanovení optimálního pH* byly prozkoumány fluorescenční vlastnosti sedmi vodných roztoků chininu o různých koncentracích kyseliny sírové. Zjištěných  $n$  hodnot intenzit emisního záření bylo zprůměrováno a zapsáno do tabulky (Tab. VIII). Tyto průměry byly následně vyneseny oproti hodnotám příslušných pH do grafu (Graf 1).

Tabulka VIII naměřené hodnoty fluorescenční intenzity pro roztoky matrice o různých pH, ( $n = 2$ )

pH	průměrná intenzita
1,27	9282,7023
2,12	9523,6777
2,73	9474,8824
3,40	7682,0168
4,28	480,0138
6,95	471,8179



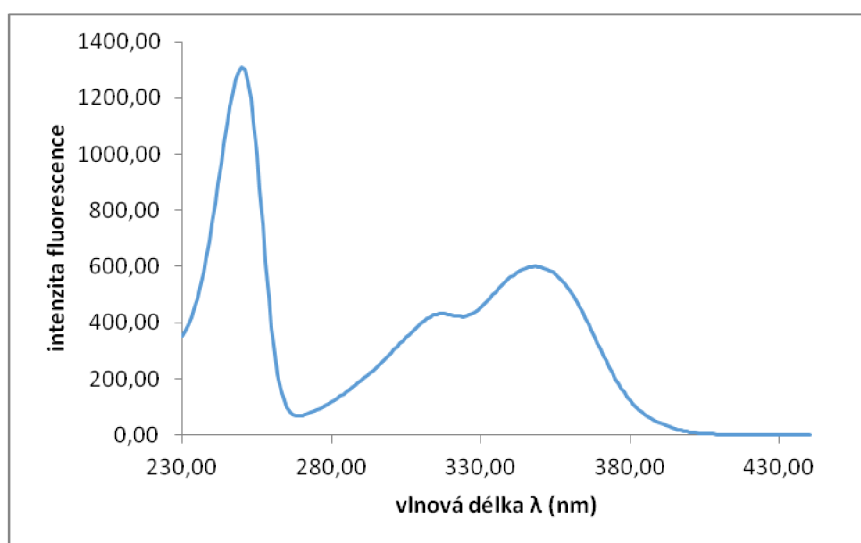
Graf 1 závislost intenzity fluorescenčního záření na pH použité směsi

Z těchto dat bylo vybráno optimum rozsahu pH, v němž je intenzita signálu pokud možno nejvyšší a hodnota pH roztoku vůči výkyvům obsahu kyseliny sírové v této oblasti nejrobustnější. Tato oblast se ukázala být při použití 10,0 ml 12,5 mmol.l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro roztok ve 25ml odměrné baňce, tedy při koncentraci kyseliny sírové v prostředí 5 mmol.l<sup>-1</sup>, kdy je pH roztoku 2,73 a jím poskytovaný fluorescenční signál 9474,882.

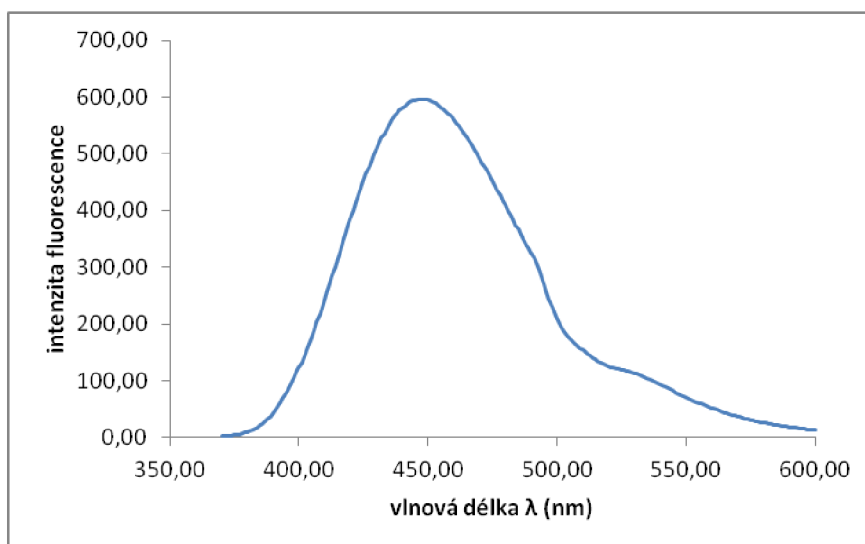
## 4.2 SPEKTRA

### 4.2.1 EXCITAČNÍ A EMISNÍ SPEKTRA

Před počátkem měření bylo třeba určit vhodné vlnové délky pro excitační a emisní záření. K tomu bylo využito spektrofluorimetru Jasco FP-8300. Po nastavení parametrů přístroje uvedených v tabulce (Tab. V) byla spuštěna měření, pročež byla získána následující spektra (Grafy 2, 3).



Graf 2 Excitační spektrum standardního roztoku chininu ( $c = 1 \text{ mg.l}^{-1}$ )

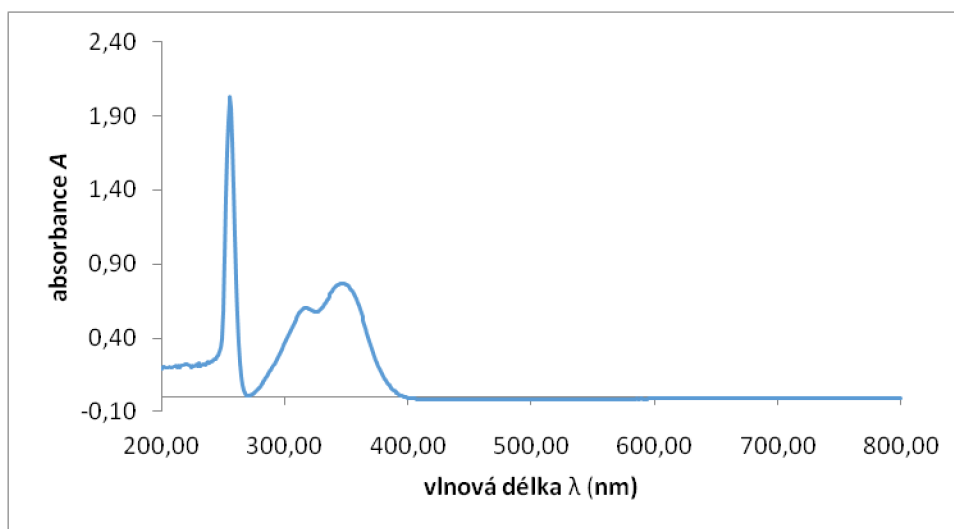


Graf 3 Emisní spektrum standardního roztoku chininu ( $c = 1 \text{ mg.l}^{-1}$ )

Excitační spektrum (Graf 2) poskytlo dvojici pásů s maximy při vlnových délkách 250 nm a 348 nm. Ve druhém ze zmíněných dvou případů zůstal signál i při malých úpravách vlnové délky značně robustní. Z emisního spektra (Graf 3) bylo zjištěno maximum intenzity při vlnové délce 448 nm, přičemž byl v jeho bezprostředním okolí signál dostatečně robustní.

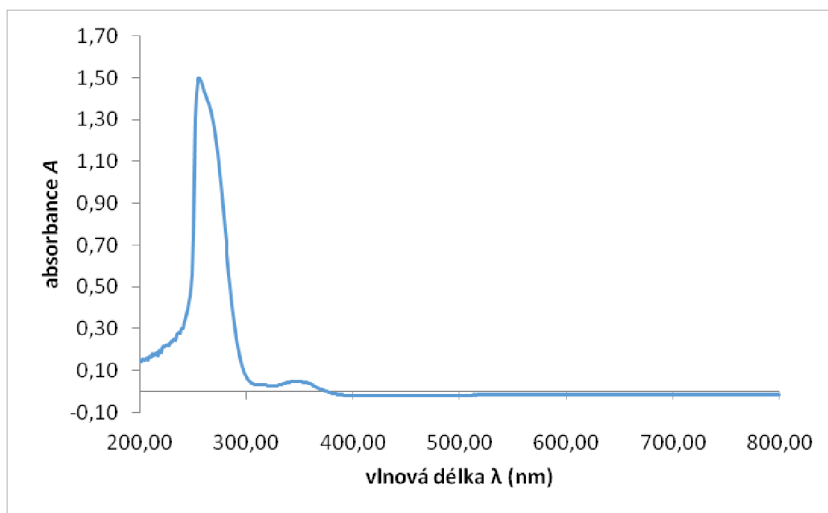
#### 4.2.2 ABSORPČNÍ SPEKTRA

Jak bude uvedeno níže, signály některých vzorků byly poměrně nízké. Pro zjištění důvodu byla vzorkům proměřena jejich absorpční spektra pro případ, že by za slabosti signálu stála absorpce některou jinou látkou obsaženou ve vzorku spolu se stanovovaným chininem. Prvním proměřeným roztokem byl standard chininu o koncentraci  $50 \text{ mg.l}^{-1}$  (ppm). Jeho spektrum je vyobrazeno na grafu (Graf 4).

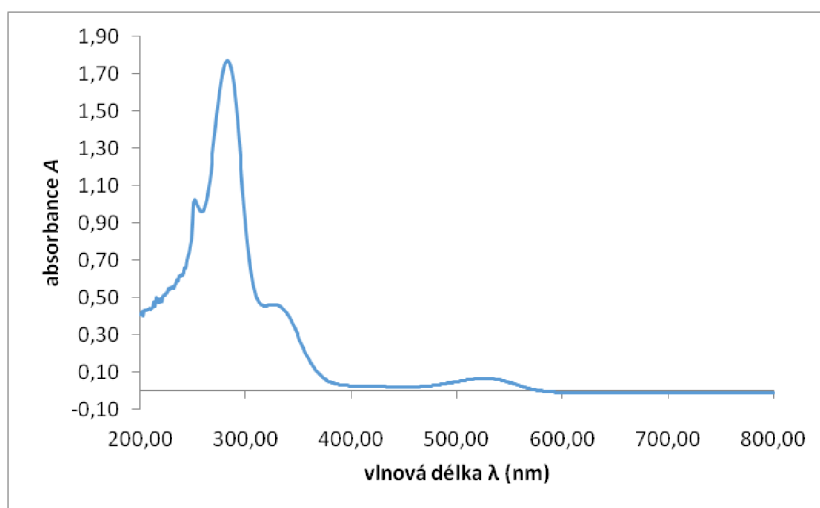


Graf 4 Absorpční spektrum standardního roztoku chininu

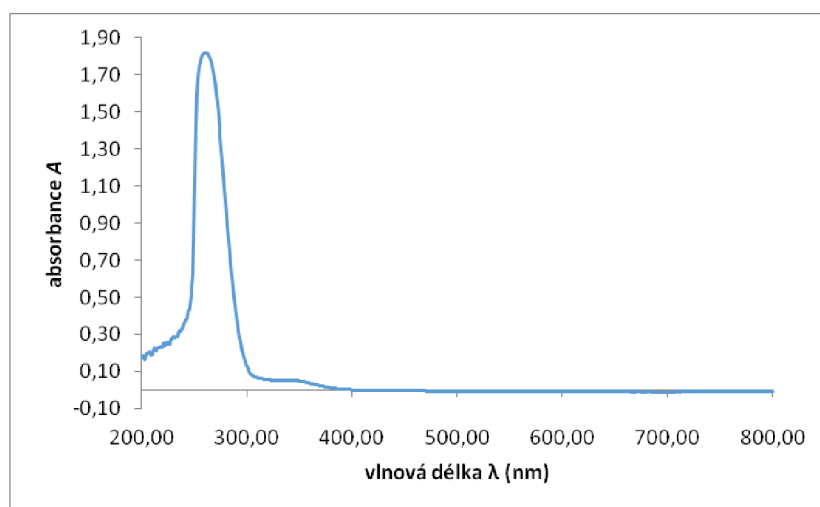
Proměřeny byly všechny vzorky. Příklady spekter některých (jednoho čirého (I), dále pak vzorku barevného (IV) a matného (VIII)) z nich jsou uvedeny níže (Grafy 5-7). V nich je možno pozorovat mnohdy jen velmi slabá maxima v okolí 350 nm. Jelikož roztoky při této vlnové délce absorbují jen velmi slabě, vysvětlují se tím slabé odezvy některých ze vzorků. Aby jejich signál dosahoval přibližně podobné absorbance A jako signál standardu, byl každý vzorek několikrát proměřen a vhodně zředěn.



**Graf 5 Absorpční spektrum vzorku I (ředěno 1:10)**



**Graf 6 Absorpční spektrum vzorku IV (ředěno 1:2)**



**Graf 7 Absorpční spektrum vzorku VIII (ředěno 1:20)**

Přestože nebyla potvrzena přítomnost látek absorbující záření v místě fluorescence (okolí 450 nm), z uvedených spekter (Grafy 5-7) je již okem patrná odchylka od signálu čistého chininu (Graf 4). V okolí 250 nm dochází u všech uvedených případů k výraznému rozšíření píku, který se v grafu (Graf 6) silně promítá i do oblasti druhého excitačního pásma při 350 nm. Samotné příspěvky v této oblasti byly obecně poměrně slabé.

Na absorpčních spektrech je v oblasti pod 250 nm rovněž pozorovatelný výrazný šum, který je možno vysvětlit skutečností, že se měření odehrávalo na okraji udávaného rozsahu použitelnosti kyvety (kyveta použitelná od 230 nm).

Ačkoliv byl tedy signál některých vzorků s použitím excitační vlnové délky 350 nm velmi slabý, použití vlnové délky 250 nm pro excitaci by mohlo způsobit zhoršení přesnosti, a to ať už vlivem interferujících jiných látek než látky stanovované, tak vlastnostmi použité kyvety.

### 4.3 POROVNÁNÍ KYVET

Již byla zmíněna možnost potenciální chyby při použití plastové kyvety v oblasti pod 230 nm. I přesto, že je tato oblast relativně daleko od 350 a 450 nm používaných k analýze, byl proměřen vliv změny materiálu kyvety na intenzitu poskytovaného signálu. Tomuto odpovídají měření 1a a 1b z tabulky (Tab. VI) při střední citlivosti.

Tabulka IX MĚŘENÍ 1a, 1b: Porovnání účinnosti křemenné (měření 1a) a plastové (1b) kyvety (kalibrační standardy), (n = 2)

c [mg.l <sup>-1</sup> ]	průměrná intenzita	
	křemenná kyveta	plastová kyveta
0,05	105,794	69,299
0,1	231,497	182,262
0,5	1201,800	1151,300
0,75	1787,675	1745,835
1	2409,585	2334,005

Směrnice přímek těchto měření byly spolehlivě lineární a pro vzorek č. V (zředěného v poměru 1:10) byly pomocí rovnice (12) zjištěny koncentrace 0,497 mg.l<sup>-1</sup> pro křemennou kyvetu a 0,498 mg.l<sup>-1</sup> pro kyvetu plastovou, jak ukazuje tabulka (Tab. IX).

Tabulka X MĚŘENÍ 1a, 1b: Stanovení koncentrace  $c_{real}$  vzorku č. V a spočtení výtěžnosti  $R_f$  přidavkem pro křemennou a plastovou kyvetu, (n = 3)

spike (xkrát)	$c_{ref}$ [mg.l <sup>-1</sup> ]	$c_{real}$ [mg.l <sup>-1</sup> ]	křemenná kyveta		plastová kyveta	
			průměrná intenzita	$R_f$	průměrná intenzita	$R_f$
0	0,000	0,497	1137,309		1190,103	
1	0,075	0,571	1313,963	99%	1378,861	104%
2	0,150	0,647	1496,162	100%	1565,413	104%

Zjištěné koncentrace byly v obou případech dostatečně podobné (rozdílná výtěžnost je v tomto případě zanedbatelná) a tak byla pro další stanovení užívána již pouze plastová kyveta.

#### 4.4 VYBRANÉ VALIDAČNÍ PARAMETRY

Tato práce pro účely validace použila tři parametrů: rozsahu kalibrace, meze detekce a výtěžnosti.

##### 4.4.1 ROZSAH KALIBRACE

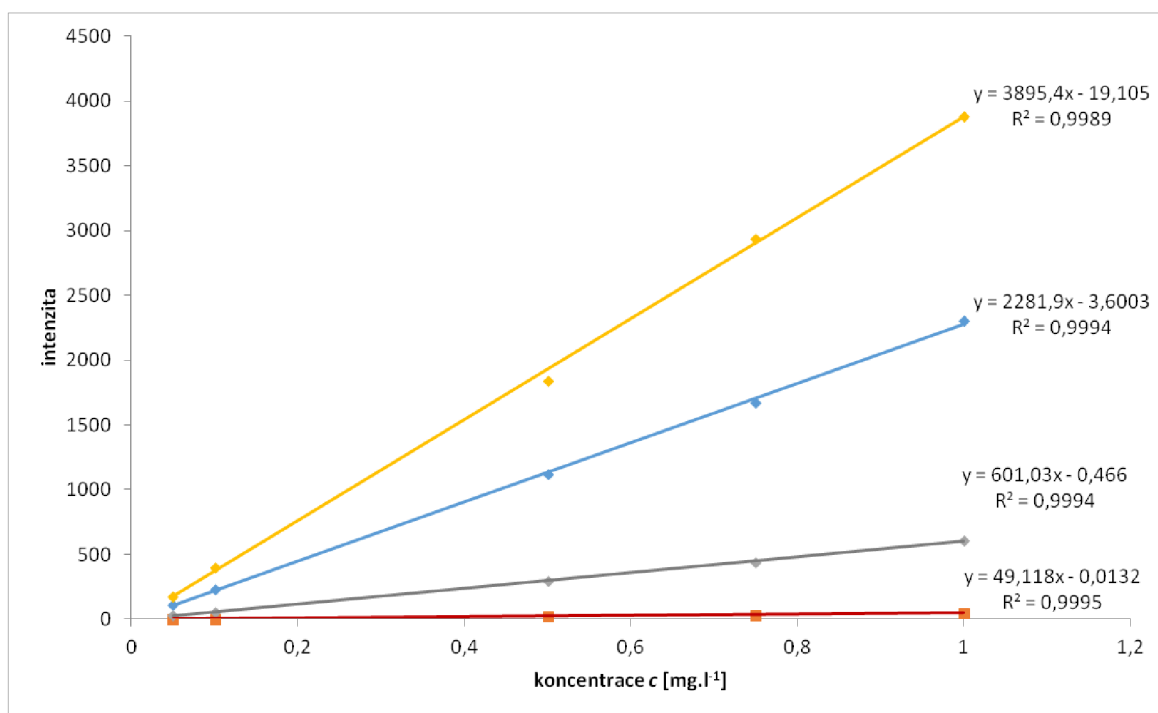
V této části, která měla za cíl vybrat nejvhodnější kombinaci parametrů, jakými jsou nastavení citlivosti přístroje a přítomnost, popř. také typ filtru, byla postupně použita všechna specifika *měření 2* z tabulky (Tab. VI), a sice konkrétně *2a* až *2d*. Rovněž byl zjišťován koncentrační rozsah, v němž je metoda použitelná a jeho vliv na tvar kalibrační závislosti.

Byla generována čtveřice kalibračních závislostí, přičemž každé náležely parametry *2a* až *2d* (Tab. VI). Každý kalibrační vzorek byl celkem třikrát proměřen a tyto hodnoty zprůměrovány (Tab. XI). Koncentrace standardů nabývaly hodnot 0,05 až 10,00 mg.l<sup>-1</sup> včetně. Po překročení hranice hodnoty intenzity 10 000 již signál nenarůstal a nebylo tedy možné v tomto rozsahu dále pracovat.

Tabulka XI MĚŘENÍ 2a-d: Kalibrační standardy a jejich intenzity, (n = 3)

c [mg.l <sup>-1</sup> ]	průměrná intenzita			
	2a	2b	2c	2d
0,050	115,709	2,519	33,731	178,540
0,100	235,993	5,107	59,828	405,442
0,500	1122,878	24,341	295,364	1839,429
0,750	1675,810	36,196	443,243	2943,823
1,000	2308,075	49,655	607,984	3886,196
<b>filtr</b>	ne	FB	FB	FA
<b>citlivost</b>	střední	nízká	střední	střední

Pro kalibraci bylo tedy zvoleno rozmezí, při němž byla kalibrační závislost stále ještě dostatečně lineární a v němž mohly být tyto závislosti vyjádřeny vedle sebe v jednom grafu (Graf 9).



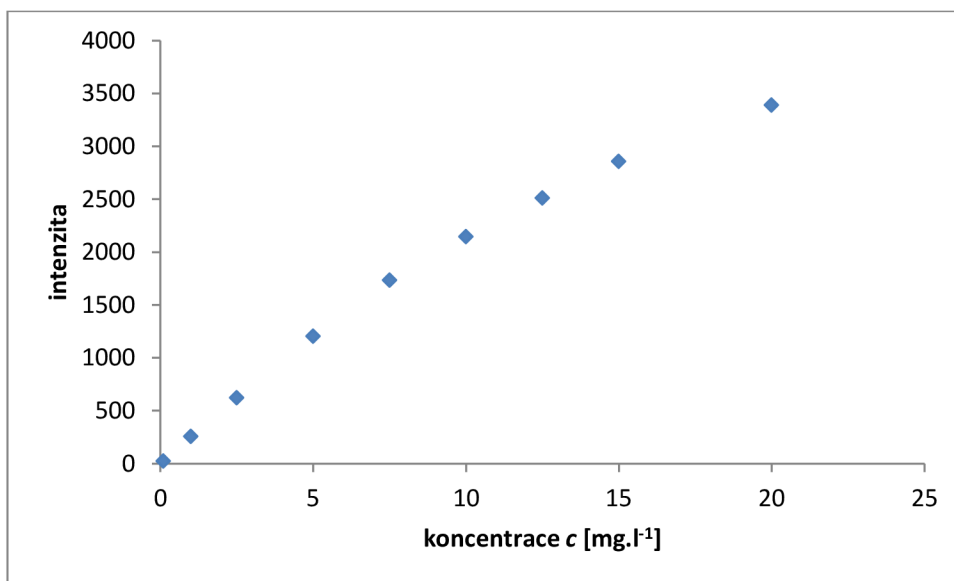
Graf 8 MĚŘENÍ 2a-d: kalibrační křivky získané za podmínek 2a (modrá), 2b (červená), 2c (šedá) a 2d (žlutá)

Z hodnot koeficientů determinace  $R^2$  je patrné, že nejpresnějších výsledků může být dosaženo s použitím podmínek 2b, tedy uskutečnit měření na nízkou citlivost s užitím účinnějšího excitačního filtru B. Využití FA pak přináší o něco horší spolehlivost výsledků spolu s výrazně nižším rozsahem intenzit, v němž je síla odezvy detektoru stále použitelná, jak je ostatně vidět v tabulce (Tab. XI). Zbylé dvě kalibrace se mezi sebou příliš neliší a jsou rovněž poměrně přesné.

Z tabulky (Tab. XI) lze předpokládat, že nastavení 2b je využitelné i pro značně vyšší koncentrace. To bylo podrobněji prozkoumáno během měření 3. Došlo k přípravě kalibrační řady (Tab. XII) s jejíž pomocí byl vygenerován graf (Graf 9). Bylo usilováno o to, aby standardy byly od sebe (ve většině případů) vzájemně vzdálené v pokud možno týchž intervalech.

Tabulka XII MĚŘENÍ 3: kalibrační roztoky a jejich intenzity, (n = 3)

c [mg.l <sup>-1</sup> ]	průměrná intenzita
0,100	25,336
1,000	257,869
2,500	623,650
5,000	1205,571
7,502	1735,844
10,000	2147,330
12,498	2512,522
14,996	2858,848
19,992	3391,421



Graf 9 MĚŘENÍ 3: Rozšířená kalibrace pro parametry 2b

Je-li tedy během měření užíván jako excitační filtr FB, může být dosaženo detekce relativně vysokých množství stanovované látky, zatímco bez použití filtru je v takových případech nutnost používat nejvýše nízkou citlivost přístroje, a to přesto jen do hmotnostní koncentrace cca 5 mg.l<sup>-1</sup>. S použitím širšího rozsahu kalibrace je však nutno počítat s přítomností rostoucí chyby spočívající v odklonu od linearitu vztahu mezi intenzitou a koncentrací.



#### 4.4.2 MEZ DETEKCE

Za účelem určení meze detekce *LOD* byl za podmínek *měření* 4 desetkrát proměřen signál slepého pokusu a kalibračního standardu ( $c = 0,010 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Jejich hodnoty (Tab. XIII) byly zprůměrovány, pročež byly pro slepý pokus a standard získány hodnoty intenzity 1,46756 a 15,59294 resp.

Tabulka XIII MĚŘENÍ 4: Intenzity signálu blanku a kalibračního standardu ( $c = 0,010 \text{ mg.l}^{-1}$ ) pro *LOD*, ( $n = 10$ )

intenzita signálu	
blank	standard
1,5716	14,9098
1,5273	15,5684
1,5174	15,7013
1,4576	15,9099
1,4445	15,5845
1,4461	15,5251
1,4276	15,6613
1,4278	15,6645
1,4280	15,6800
1,4277	15,7246

Směrodatná odchylka z měřených hodnot byla programem *MS Excel 2007* z hodnot sloupce blanku určena na 0,0493. Podle rovnice (14) pak takto vypočtená mez detekce *LOD* byla  $1,05 \cdot 10^{-4} \text{ mg.l}^{-1}$ .

#### 4.4.3 VÝTĚŽNOST

Výtěžnost byla určena s pomocí rovnice (13). Vybrané vzorky (I, III, VIII a X) byly podstoupeny „spikování“ 1 ml standardu o koncentraci  $1,000 \text{ mg.l}^{-1}$  do 25 ml baňky obsahující 2,500 ml 10krát zředěného vzorku. Pro výpočet bylo použito směrnice kalibrační přímky z *kap. 4.6. Fluorimetrická analýza vzorků*. Výsledné hodnoty zachycené v tabulce (Tab. XIV) si byly vzájemně poměrně blízké ( $100 \pm 5 \%$ ) a jejich rozdíly proto zanedbatelné.

Tabulka XIV MĚŘENÍ 4: Intenzity, vypočtené koncentrace a faktory výtěžnosti  $R_f$  vzorků I, III, VIII a X, (n = 3)

vzorek	$c_{ref}$ [mg.l <sup>-1</sup> ]	průměrná intenzita	$c_{real}$ [mg.l <sup>-1</sup> ]	$R_f$
I	0,000	409,0024	0,49	
	0,200	563,6254	0,68	97%
	0,400	725,2892	0,88	99%
III	0,000	304,9126	0,36	
	0,200	467,3459	0,56	102%
	0,400	631,4090	0,77	102%
VIII	0,000	366,8748	0,43	
	0,200	533,0470	0,64	104%
	0,400	703,2941	0,86	105%
X	0,000	611,3931	0,74	
	0,200	773,9462	0,94	102%
	0,400	939,0096	1,15	103%

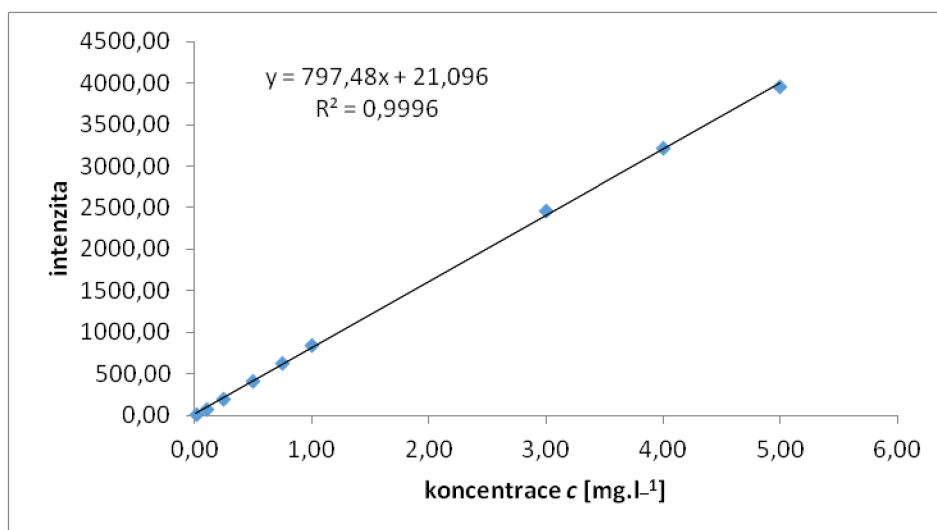
#### 4.5 FLUORIMETRICKÁ ANALÝZA VZORKŮ

V měření číslo 4 bylo za příslušných parametrů z tabulky (Tab. VI) provedeno stanovení chininu ve všech vzorcích (I-XII). Použitý kalibrační rozsah se skládal z celkem 9 kalibračních standardů, jejichž koncentrace a jim příslušející intenzity fluorescenčního záření jsou uvedeny v tabulce (Tab. XV).

Tabulka XV MĚŘENÍ 4: koncentrace a intenzity kalibračních roztoků, (n = 3)

c [mg.l <sup>-1</sup> ]	průměrná intenzita
0,010	15,593
0,100	79,429
0,250	200,728
0,500	416,498
0,750	626,286
1,000	853,979
3,000	2462,103
4,000	3222,932
5,000	3963,204

Z těchto dat z tabulky (Tab. XV) byl vytvořen graf (Graf 10). Ze směrnice body proložené přímkou byly s užitím rovnice (12) získány koncentrace jednotlivých vzorků  $c_{kyveta}$  v kyvetě a  $c_{real}$  ve vzorku po započtení faktoru ředění. Všechny takto získané hodnoty byly zapsány do tabulky (Tab. XVI). U vzorků bylo usilováno o to, aby bylo vzorek nutno ředit co nejméně a pokud možno uniformně (min. 10krát).



Graf 10 MĚŘENÍ 4: Graf kalibrační závislosti

Tabulka XVI MĚŘENÍ 4: Koncentrace vzorků I-XII stanovené fluorescenční spektrometrií (ckyveta značí koncentraci chininu v květě, c<sub>real</sub> koncentraci před zředěním), (n = 3)

vzorek	ředění (xkrát)	průměrná intenzita	c <sub>kyveta</sub> [mg.l <sup>-1</sup> ]	c <sub>real</sub> [mg.l <sup>-1</sup> ]
I	10	3647,3370	4,55	45,5
II	20	3014,6767	3,75	75,1
III	10	2355,8813	2,93	29,3
IV*	10	183,6758	0,22	2,2
V	20	2141,8692	2,66	53,2
VI	1000	1229,7850	1,52	1515,6
VII	10	4,0848	-	-
VIII	10	2998,6160	3,73	37,3
IX	10	11,1203	-	-
X	20	2819,3311	3,51	70,2
XI	30	2367,4089	2,94	88,3
XII*	10	505,6135	0,60	6,0

\* pro výpočet koncentrací byla použita směrnice *ochuzené* kalibrační křivky (pouze prvních 6 bodů)

Neboť byly signály vzorků VII a IX slabší, než signál nejméně koncentrovaného kalibračního standardu, nebylo u nich s použitím daného rozsahu kalibrace a excitace při 350 nm možné spolehlivě stanovit obsah v nich přítomného chininu. Řešením by mohla být analýza nezředěného vzorku.

Pro vzorky IV a XII, jejichž naměřené intenzity byly oproti ostatním rovněž podstatně slabší, bylo pro zvýšení přesnosti výsledků u vzorků v této oblasti použito *ochuzené* kalibrace (0,010 – 1,000 mg.l<sup>-1</sup>).

#### 4.6 DISKUSE VÝSLEDKŮ

V průběhu této práce byla získaná mez detekce LOD  $1,05 \cdot 10^{-4} \text{ mg.l}^{-1}$ . Ta dosahuje v porovnání s mezí detekce ze studie [75] z tabulky (Tab. I) používající pro stanovení chininu téže fluorimetrické metody (LOD =  $4 \cdot 10^{-3} \text{ mg.l}^{-1}$ ) osmatřicetinásobného zlepšení. Zmíněná studie ve vzorku odhalila přítomnost  $36,50 \pm 0,42 \text{ mg.l}^{-1}$  chininu. Komerční název zkoumaného vzorku toniku v ní bohužel není uveden a nezaobírá se ani faktorem výtěžnosti. Daná česká vyhláška č. 447/2004 Sb. ani zbylá referovaná legislativa zmínky o mezi detekce rovněž neobsahuje.

## 5 ZÁVĚR

Pomocí metody fluorescenční spektrometrie byly prověřeny dopady pH, materiálu kyvety a přítomností různých typů filtrů na intenzitu přístrojem registrovaného emisního záření a spolehlivost měření. Bylo odhaleno, že typ zkoušených materiálu nijak zásadně neovlivňuje kvalitu měření a že při nízké citlivosti přístroje je možno spolehlivě měřit i při koncentracích kolem  $5 \text{ mg.l}^{-1}$ . Mez detekce LOD měření nabývá  $1,05 \cdot 10^{-4} \text{ mg.l}^{-1}$ . Bylo dosaženo výtěžností pohybujících se mezi 97 a 105 %.

Dále proběhlo rovněž stanovení chininu ve dvanácti potravinových vzorcích, z čehož 11 z nich byly toniky a 1 přípravek na výrobu domácího SodaStreamu. U dvou z těchto vzorků (VII, IX) nebylo možné obsah látky spolehlivě určit z důvodu nízkého fluorescenčního signálu při použití excitačního záření o vlnové délce 350 nm. Použitím záření při 250 nm by dosahované signály byly vyšší, avšak měření by tak mohlo být značně zkresleno vlivem potenciálních interferentů, jejichž přítomnost s užitím dat této práce nelze vyvrátit. Vzorek II vykazuje koncentraci na hranici zákonem povoleného množství vyhláškou č. 447/2004 Sb., vzorky XI a VI pak tuto mez překračují, ačkoliv vzorek VI není určen k přímé konzumaci a je náplní pro 18 velkých SodaStream lahví nápoje.

V obou případech, v nichž je překročen českou vyhláškou stanovené mezní množství, se jedná o zboží zahraniční výroby, a ačkoliv nevyhovuje české legislativě, zpráve EFSA v zásadě nijak neodporuje.

## CITOVANÁ LITERATURA

- [1] G. Joos, I. M. Freeman, Theoretical Physics, ThriftBooks-Dallas, Dallas 1987.
- [2] D. Halliday, R. Resnick, J. Walker, Fyzika: vysokoškolská učebnice obecné fyziky, Prometheus, Praha 2000.
- [3] D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, Principles of Instrumental Analysis, seventh ed., Cengage Learning, Boston, 2018.
- [4] B. Valeur, M. N. Berberan-Santos, Molecular Fluorescence: Principles and Applications, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001.
- [5] W. E. Galen, Instrumental Methods of Chemical Analysis, International Student Edition, McGraw-Hill Book, Kógakusha, Tokyo, 1969.
- [6] Encyclopedia Britannica, Radiation.  
<https://www.britannica.com/science/radiation>, staženo 14. dubna 2023.
- [7] N. S. Bayliss, The Permicron: a Unit of Wave Number, Nature, 3. březen 1951, 167.
- [8] K. Štefan, J. Leško, Spektrálne metódy v organickej chémii, Vydavateľstvo Technickej a Ekonomickej Literatúry, 1780.
- [9] H. C. Ishikawa-Ankerhold, R. Ankerhold, G. P. C. Drummen, Advanced fluorescence microscopy techniques - FRAP, flip, flap, FRET and flim, ResearchGate, 2. dubna 2012.
- [10] VŠCHT, FLUORIMETRIE.  
<http://old.vscht.cz/anl/lach2/FLUORO.pdf>
- [11] Encyclopedia Britannica, Luminiscence.  
<https://www.britannica.com/science/luminescence>, staženo 15. dubna 2023.
- [12] Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Spektrální metody studia chemických látek.  
[https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/afc/Studijni\\_materialy/Spektralni\\_metody.pdf](https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/afc/Studijni_materialy/Spektralni_metody.pdf), staženo 15. dubna 2023]
- [13] P. Kubáček, Z. Michaličková, Základy fyzikální chemie, Masarykova univerzita, Brno 2014.
- [14] C. E. Housecroft, A. G. Sharpe, Anorganická chemie, VŠCHT, 2014.
- [15] Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Laboratorní technika KBC/LABT.  
[https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/biochemie/Dokumenty/Materialy\\_k\\_vyuce/KBC-LABT\\_Laboratorni\\_tehnika\\_2023.pdf](https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/biochemie/Dokumenty/Materialy_k_vyuce/KBC-LABT_Laboratorni_tehnika_2023.pdf), staženo 20. dubna 2023.
- [16] D. Vondrák, J. Vulterin, Analytická chemie, SNTL, Praha 1985.

- [17] AURIGA Research, Lab-training: experience beyond books.  
<https://lab-training.com/what-factors-contribute-to-deviations-from-the-beer-lamberts-absorbance-law/>, staženo 14. dubna 2023.
- [18] V. Masilamani, a další, Using a Spectrofluorometer for Resonance Raman Spectra of Organic Molecules, *Journal of Spectroscopy*, sv. 2017, 2017.
- [19] F. Jursík, *Anorganická chemie kovů*, VŠCHT, Praha 2002.
- [20] P. T. C. So, Ch. Y. Dong, Fluorescence Spectrophotometry, *Encyclopedia of Life Sciences*, 20. června 2001.
- [21] T. Schweizer, H. Kubach, T. Koch, Investigations to characterize the interactions of light radiation, engine operating media and fluorescence tracers for the use of qualitative light-induced fluorescence in engine systems, *Automotive and Engine Technology*, 2021, 275-287.
- [22] K. G. Fleming, Fluorescence Theory, v knize: C. Lindon, G. E. Tranter, D. W. Koppenaal, *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, third ed., Elsevier, Baltimore 2017, 647-653.
- [23] A. D. McNaught, A. Wilkinson, S. J. Chalk, *Compendium of Chemical Terminology (the IUPAC "Gold Book")*, second ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford 1997.
- [24] D. Koliňová, Problém zhášení v atomové fluorescenční spektrometrii, v knize: I. Kleinmann, a další, *Nové poznatky v plamenové spektroskopii*, Československá spektroskopická společnost při ČSAV, 1971
- [25] A. Samohkvalov, Analysis of various solid samples by synchronous fluorescence spectroscopy and related methods: A review, sv. 216, 15. srpna 2020, *Talanta* 2020.
- [26] M. Jelínek, Návrh metody pro zvýšení přesnosti měření optického frekvenčního spektra laditelnými optickými filtry, diplomová práce, VŠCHT, Brno 2016.
- [27] LightTrans International, Monochromators simulated with ray and field tracing. LightTrans.  
<https://www.lighttrans.com/applications/optical-metrology/monochromators.html>, staženo 29. dubna 2023.
- [28] BrandTech Scientific, BRAND UV-Cuvettes, Comparison with Quartz and other Plastic Cuvettes.  
<https://www.brandtech.com/wp-content/uploads/cuvettegraph.pdf>, staženo 13. listopadu 2022
- [29] FireFlySci, How to Select Cuvettes for UV VIS Measurements & Cuvette Material Guide.  
<https://www.fireflysci.com/news/2015/7/6/how-to-select-cuvettes-for-uv-vis-measurements-cuvette-material-guide>, staženo 29. dubna 2023.

- [30] BRAND, Life Science and Liquid Handling: Laboratory Equipment from BRAND.  
[https://www.brand.de/brand/contentserv\\_data/Context/BRAND%20GMBH%20%2B%20CO%20KG/Dokumente/Produkte/Technische\\_Datenblaetter/Life%20Science/Kuevetten/D ata\\_sheet\\_Cuvettes\\_4\\_clear\\_sided\\_EN.pdf](https://www.brand.de/brand/contentserv_data/Context/BRAND%20GMBH%20%2B%20CO%20KG/Dokumente/Produkte/Technische_Datenblaetter/Life%20Science/Kuevetten/D ata_sheet_Cuvettes_4_clear_sided_EN.pdf), staženo 29. dubna 2023.
- [31] JASCO Corporation, Fluorescence Measurement of Solid Samples.  
<https://jascoinc.com/products/spectroscopy/fluorometer/fluorometer-accessories/fluorescence-measurement-solid-samples/>, staženo 30. dubna 2023.
- [32] Hitachi High-Technologies Corporation, Solid Sample Measurement.  
[https://www.hitachi-hightech.com/file/global/products/science/appli/ana/fl/solid/fl\\_120005.pdf](https://www.hitachi-hightech.com/file/global/products/science/appli/ana/fl/solid/fl_120005.pdf), staženo 30. dubna 2023.
- [33] Agilent Technologies, Inc., Application Note: Quantify Quinine in Beverages Using the Agilent Cary Exlipse Spectrofluorometer and a Fiber Optic Dip Probe, Agilent Technologies, <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-6268EN.pdf>, staženo 30. dubna 2023.
- [34] University of Cambridge, Products of the Empire: Cinchona: a short history.  
<https://www.lib.cam.ac.uk/rcs/projects-exhibitions/products-empire-cinchona-short-history>, staženo 10. října 2022.
- [35] Encyclopedia Britannica, Cinchona: Description, history & facts.  
<https://www.britannica.com/plant/Cinchona>, staženo 1. března 2023.
- [36] BBC, The tree that changed the world map.  
<https://www.bbc.com/travel/article/20200527-the-tree-that-changed-the-world-map>.
- [37] Gachelin, G., a další, Evaluating Cinchona bark and quinine for treating and preventing malaria, *Journal of the Royal Society of Medicine* 110, sv. 1 (2017), 31-40.
- [38] A. Goss, Building the world's supply of quinine: Dutch colonialism and the origins of a global pharmaceutical industry, *Elsevier* 3, sv. 38 (2014), 8-18.
- [39] T. S. Kaufman, E. A. Rúveda, The Quest for Quinine: Those Who Won the Battles and Those Who Won the War, *Angewandte Chemie* 44, sv. 6 (2005), 854-885.
- [40] J. Minor, Quinine, v knize: P. Robbins, *Encyclopedia of Environment and Society: 1 Thousand Oaks*, SAGE Publications 1, Inc., 2007
- [41] National Center for Biotechnology Information, PubChem Compound Summary for CID 3034034, Quinine.  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Quinine>, staženo 10. října 2022.
- [42] J. M. Cowan, Cinchona in the Empire: Progress and Prospects of its Cultivation. *Empire Forestry Journal* 7, Sv. 8 (1929), 45-53.



- [43] Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Appolinaire Bouchardat. <https://www.redalyc.org/journal/1812/181249883006/html/>, staženo 23. dubna 2023.
- [44] J. Achan, a další, Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment o malaria, *Malaria Journal* 144, sv. 10 (2011)
- [45] National Center for Biotechnology Information, PubChem Compound Summary for CID 441074, Quinidine, staženo 10. října 2022. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Quinine>, staženo 10. října 2022.
- [46] Colby College, Characterization of Quinine and Its Determination. <https://www.colby.edu/chemistry/CH332/laboratory/Quinine%20fluorescence.pdf>, staženo 10. října 2022.
- [47] Y. Guo, a další, Studies of the effect of halide ions on the fluorescence of quinine sulfate, *Wiley Luminiscence* 4 (2019), sv. 38, 450-455.
- [48] K. J. Arrow, C. Panosian, H. Gelband, *A brief History of Malaria - Saving Lives, Buying Time: Economics of Malaria Drugs in an Age of Resistance*, National Academies Press (US), Washington DC 2004
- [49] L. R. Wolf, E. J. Otten, M. P. Spadafora, Two case reports and review of acute quinine toxicity and treatment, *The Journal of Emergency Medicine* 4, (1992) sv. 10, 295-301.
- [50] K. Walker, M. Nesbitt, *Just the Tonic: A natural History of Tonic Water*, Kew Publishing, London 2019.
- [51] J. G. Woodland, K. Chibale, Quinine fever, *Nature chemistry* 122 (2022), sv. 14, 112
- [52] A. R. van der Hoogte, T. Pieters, Science in the service of colonial agro-industrialism: The case of cinchona cultivation in the Dutch and Britisch East Indies, 1852-1900, *Elsevier pt. A* (2014), sv. 47, 12-22
- [53] K. Sanderson, A tonic for quinine chemistry, *Nature* (2008), 554
- [54] R. L. Furner, G. B. Brown, J. W. Scott, A method for differentiation and analysis of quinine and quinidine by gas chromatography/mass spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology* 6 (1981), sv. 5, 275-278.
- [55] V. Nair, S. Vellalath, *Molecule Matters: The Quinine Story: A 100-Year Saga*, *Resonance* 3 (2011), sv. 13, 254-260.
- [56] J. I. Seeman, The Woodward–Doering/Rabe–Kindler Total Synthesis of Quinine: Setting the Record Straight, *Angewandte Chemie, international edition* 9 (2007), sv. 46, 1378-1413.
- [57] Nair, Vijay, Menom, Rajeev S., S. Vellalath, Asymmetric Synthesis of Quinine: A Landmark in Organic, *Natural Product Communications* 10 (2006), sv. 1, 899-905.

- [58] R. B. Woodward, N. L. Wendler, F. J. Brutschy, Quinone, *Journal of the American Chemical Society* 9 (1945), sv. 67, 1425-1429.
- [59] A. C. Smith, R. M. Williams, Rabe Rest in Peace: Confirmation of the Rabe–Kindler Conversion of d-Quinotoxine Into Quinine: Experimental Affirmation of the Woodward–Doering Formal Total Synthesis of Quinine, *Angewandte Chemie International Edition* 9 (2008), sv. 47, 1736-1740.
- [60] J. Igarashi, a další, Stereocontrolled synthesis of quinine and quinidine, *Tetrahedron Letters* 19 (2004), sv. 45, 3693-3838.
- [61] I. T. Raheem, S. N. Goodman, E. N. Jacobsen, Catalytic Asymmetric Total Syntheses of Quinine and Quinidine, *Journal of the American Chemical Society* 3 (2004), 706-707.
- [62] O. Illa, a další, Practical and Highly Selective Sulfur Ylide Mediated Asymmetric Epoxidations and Aziridinations Using an Inexpensive, Readily Available Chiral Sulfide. Applications to the Synthesis of Quinine and Quinidine, *Journal of the American Chemical Society* 6 (2010), sv. 132, 1828-1830.
- [63] Centers for Disease Control of Prevention, Malaria.  
<https://www.cdc.gov/malaria/>, staženo 16. července 2020.
- [64] World Health Organization, Malaria.  
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria/>, staženo 29. března 2023.
- [65] D. Goswami, N. K. Minakh, S. H. I. Kappe, Malaria parasite liver stages, *Journal of Hepatology: The Home of Liver Research* 3 (2021), sv. 76, 735-737.
- [66] Ch. L. Winek, a další, Quinine Fatality - Case Report, *Clinical Toxicology* 2 (1974), sv. 7, 129-132.
- [67] A. L. Dannenberg, S. F. Dorfman, J. Johnson, Use of quinine for self-induced abortion, *South Medical Journal* 7 (1983), sv. 76, 846-849.
- [68] D. N. Bateman, E. H. Dyson, Quinine toxicity. *Adverse Drug React Acute Poisoning Review* 4 (1986), sv. 5, 215-233.
- [69] P. Bacon, D. J. Spalton, S. E. Smith, Blindness from quinine toxicity, *British Journal of Ophthalmology* (1988), sv. 72, 219-224.
- [70] X. C. A. Feás, C. Fente, Fast and Sensitive New High Performance Liquid Chromatography Laser Induced Fluorescence (HPLC-LIF) Method for Quinine: Comparative Study in Soft Drinks, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 10 (2009), sv. 32, 2600-2614.
- [71] A. P. Hall, a další, Quinine induced blindness, *British Journal of Ophthalmology* (1997), sv. 81, 1029.

- [72] J. G. Marques, a další, Tonic water: A rare cause of exanthema, *Allergologia et immunopathologia* 1 (2012), sv. 40, 60-61.
- [73] A. Sagar, S. Mukherji, A Case of Quinine Induced Blindness, *Med Journal Armed Forces India* 1 (2010), sv. 66, 97.
- [74] Alcohol and Tobacco Tax and Trade Bureau: U.S. Department of the Treasury, Limited Ingredients.  
<https://www.ttb.gov/scientific-services-division/limited-ingredients#a>, staženo 10. října 2022.
- [75] Q. Chen, J. Wang, Determination of quinine in drinks by reversed-phase ion-pair chromatography, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 9 (2007), sv. 24, 1341-1352.
- [76] Federal Drug Agency, Code of Federal Regulations,  
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/CFRSearch.cfm?fr=172.510>, staženo 23. dubna 2023.
- [77] European Food Safety Authority, Flavouring Group Evaluation 35: Three quinine salts from the Priority list from chemical group 30; Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food, *The EFSA Journal* (2008), sv. 739, 1-18.
- [78] Vyhláška č. 447/2004 sb.: O požadavcích na množství a druhy látek určených k aromatizaci potravin, podmínky jejich použití, požadavky na jejich zdravotní nezávadnost a podmínky použití chininu a kofeinu – Poznámky pod čarou: Podmínky použití kofeinu a chininu při výrobě potravin.
- [79] X. Feás, C. A. Fente, A. Cepeda, Fast and sensitive new high performance liquid chromatography laser induced fluorescence (HPLC-LIF) method for quinine. Comparative study in soft drinks, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 17 (2009), sv. 32, 2600-2614.
- [80] P. D. Tzanavaras, a další, High-Throughput Determination of Quinine in Beverages and Soft Drinks Based on Zone-Fluidics Coupled to Monolithic Liquid Chromatography, *Analytical Letters* (2013), sv. 46, 1718-1731.
- [81] J. C. Reijenga, a další, Determination of quinine in beverages, pharmaceutical preparations and urine by isotachopheresis, *Fourth International Symposium on Isotachopheresis* 1 (1985), sv. 320, 245-252.
- [82] A. D. Riyaz, a další, Electrochemical studies of quinine in surfactant media using hanging mercury drop electrode: A cyclic voltammetric study, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2012), 98, 72-79.

[83] JASCO Corporation, Hardware/Function Manual 0302-3900D: FP-8200/8300/8500/8600 Spectrofluorometer, Jasco, srpen 2016.

[84] Agilent Technologies, Chemical Analysis, Life Sciences, and Diagnostics. <https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/5991-3851EN.pdf>. 5991-3851 EN, staženo 12. dubna 2023.

[85] L. R. Wolf, E. J. Otten, M. P. Spadofora, Cinchonism: Two case reports and review of acute quinine toxicity and treatment, *The Journal of Emergency Medicine* 3 (1992), sv. 10, 295-301.

[86] Encyclopedia Britannica, Western colonialism - The Sinai-Suez campaign, Encyclopedia, <https://www.britannica.com/topic/Western-colonialism>, staženo 10. října 2006.