

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

**STANOVENÍ LÉČIV AUTOMATIZOVANÝMI PRŮTOKOVÝMI
METODAMI S VYUŽITÍM CHEMILUMINISCENČNÍ DETEKCE**

DISERTAČNÍ PRÁCE

2009

MGR. KATEŘINA MERVARTOVÁ

Poděkování

Chtěla bych upřímně poděkovat panu Doc. RNDr. Miroslavu Poláškoví, CSc. za trpělivost a starostlivost, kterou mi během studia věnoval, a především za cenné rady a zkušenosti vedoucí k řešení jednotlivých úkolů.

Panu prof. RNDr. Petru Solichovi, CSc. vděčím za motivaci a za jeho zkušenosti užitečné nejen při PhD studiu ale platné i v profesním a osobním životě.

Panu prof. José Martínez Calatayudovi patří dík za pomoc při dokončování rešeršní práce.

Dále bych ráda poděkovala všem svým kolegům katedry analytické chemie za vstřícnost a skvělou atmosféru, která na tomto pracovišti vládla.

Děkuji grantovým agenturám FRVŠ a GAUK za finanční podporu mé výzkumné práce.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Praze 20.05.2009

Martina

OBSAH

Seznam zkratk	6
1 Úvod	7
2 Cíl práce	9
3 Teoretická část	10
3.1 Rozdělení a charakteristika průtokových metod	11
3.1.1 Automatizace analytických metod.....	11
3.1.2 Průtokové neseparační analytické metody.....	13
3.1.3 Průtoková injekční analýza.....	16
3.1.4 Multikomutační metoda.....	18
3.1.5 Sekvenční injekční analýza.....	19
3.1.6 Současné trendy.....	22
3.2 Luminiscenční metody	24
3.2.1 Fluorescence.....	26
3.2.2 Principy chemiluminiscence.....	27
3.2.3 Nepřímé chemiluminiscenční metody.....	31
3.2.3.1 Reakce luminolu.....	31
3.2.3.2 Peroxyoxalátová reakce.....	31
3.2.3.3 Reakce siřičitanu.....	32
3.2.3.4 Ostatní nepřímé CL reakce.....	32
3.2.4 Přímé CL reakce.....	34
3.2.4.1 Reakce manganu.....	34
3.2.4.2 Reakce komplexů ruthenia.....	35
3.2.5 Bioluminiscence a elektrochemiluminiscence.....	37
3.2.6 Aplikace.....	38
3.3 Spojení chemiluminiscence a průtokových metod	40
3.3.1 Přístrojové vybavení průtokové CL.....	40
3.3.2 Chemiluminiscence a průtokové metody.....	42
4 Výsledková část s komentáři k publikovaným pracím a rukopisům	44
4.1 Přehled publikovaných prací.....	45
4.2 FIA/SIA a chemiluminiscence ve farmacii.....	48
4.3 Chemiluminiscenční stanovení pesticidu chlorsulfuronu pomocí průtokové multikomutační metody.....	55
4.3.1 Optimalizace metody.....	55
4.3.2 Validace metody.....	56
4.4 Automatizovaný sekvenční injekční analyzátor pro sledování uvolňování léčiva z polotuhých topických přípravků.....	59
4.4.1 Výsledky a diskuze.....	59
4.5 Chemiluminiscenční stanovení léčiv metodou sekvenční injekční analýzy.....	62
4.5.1 Stanovení indometacinu v masti a gelu.....	64
4.5.2 Stanovení verapamilu v tabletách.....	66
4.6 Vliv organických rozpouštědel na CL reakce manganistanu a komplexu ruthenia(III) s vybranými léčivy.....	68
4.6.1 Výsledky a diskuze.....	69

5	Přílohy	70
5.1	Příloha 1: K. Mervartová, M. Polášek, J. Martínez Calatayud, Recent applications of flow-injection and sequential-injection analysis techniques to chemiluminescence determination of pharmaceuticals, J. Pharm. Biomed. Anal. 45 (2007) 367-381.....	70
5.2	Příloha 2: K. Mervartová, M. Catalá Icardo, J. Martínez Calatayud, A fully automated assembly using solenoid valves for the photodegradation and chemiluminometric determination of the herbicide Chlorsulfuron, Anal. Lett. 38 (2005) 179 – 194.....	86
5.3	Příloha 3: J. Klimundová, K. Mervartová, H. Sklenářová, P. Solich, M. Polášek, Automated sequential injection fluorimetric set-up for multiple release testing of topical formulation, Anal. Chim. Acta 573-574 (2006) 366-370.....	103
5.4	Příloha 4: K. Mervartová, M. Polášek, J. Martínez Calatayud, Sequential injection analysis (SIA) – chemiluminescence determination of indomethacin using tris[(2,2'-bipyridyl)]ruthenium(III) as reagent and its application to semisolid pharmaceutical dosage forms, Anal. Chim. Acta 600 (2007) 114-121	109
5.5	Příloha 5: K. Mervartová, M. Polášek, D. Lopez, J. Martínez Calatayud, Rapid automated chemiluminescence determination of verapamil by sequential injection analysis (SIA) using tris[(2,2'-bipyridyl)]ruthenium(III) complex as reagent and its application to analysis of tablets, připraveno k publikaci.....	118
5.6	Příloha 6: K. Mervartová, M. Polášek, Effect of organic solvents on chemiluminescence reactions, připraveno k publikaci.....	131
5.7	Abstrakty prezentované na vědeckých konferencích.....	147
6	Grantová podpora	154
7	Závěr	155
8	Shrnutí	157
9	Summary	158
10	Literatura	159

Seznam zkratk

CL	chemiluminiscence
CTMAB	cetyltrimetylamonium bromid
ECL	elektrochemiluminiscence
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (americká státní autorita v oblasti regulace potravin a léčiv)
FIA	průtoková injekční analýza (<i>flow injection analysis</i>)
GC	plynová chromatografie (<i>gas chromatography</i>)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IČ	infračervené záření
Lab-on-chip	analytický systém integrovaný na čipu o velikosti několika čtverečných centimetrů
LC	kapalinová chromatografie (<i>liquid chromatography</i>)
LOD	limit detekce (<i>limit of detection</i>)
LOV	<i>lab-on-valve</i>
MC	multikomutační metoda (<i>multicommutation</i>)
MIP	<i>molecular imprinted polymer</i>
MSFIA	průtoková injekční analýza využívající více pístových pump (<i>multisyringe flow injection analysis</i>)
PMT	fotonásobič (<i>photomultiplier tube</i>)
RAM	<i>restricted access material</i>
RSD	relativní směrodatná odchylka (<i>relative standard deviation</i>)
SD	směrodatná odchylka (<i>standard deviation</i>)
SDS	dodecylsulfát sodný
SFA	segmentovaná průtoková analýza (<i>segmented flow analysis</i>)
SIA	sekvenční injekční analýza (<i>sequential injection analysis</i>)
SIC	sekvenční injekční chromatografie (<i>sequential injection chromatography</i>)
μTAS	minimalizovaný analytický systém (<i>micro total analysis system</i>)
TCFO	bis(2,4,6-trichlorofenyl)oxalát;
UV	ultrafialové záření

1 Úvod

Neseparační průtokové metody, průtoková injekční analýza (FIA) a sekvenční injekční analýza (SIA), představují inovativní způsob automatizace analytických postupů [1-3]. Z historického hlediska se jedná o metody moderní, jejichž rozvoj spadá do konce druhé poloviny dvacátého století. Starší a také nejrozšířenější neseparační průtokovou technikou je FIA. Tok nosného proudu je ve FIA uspořádání kontinuální. Nosný proud se zde definovaným způsobem mísí s proudy roztoků činidel. K reakci analytu s činidlem dochází po vnesení zóny vzorku do systému a vznikající produkt je unášen do detektoru. Na rozdíl od FIA je u modernější techniky SIA tok nosného média nespojitý (diskontinuální). Mezi výhody FIA a SIA patří možnost využití prakticky všech známých instrumentálních metod detekce. V současnosti se v průtokových metodách nejčastěji používá UV-VIS spektrofotometrická detekce.

Přestože je jev chemiluminiscence (CL) znám již více než 2000 let, k praktickému využití CL v analytické chemii dochází až ve 20. století [4, 5]. V klasické manuální CL analýze hrály hlavní roli CL reakce založené na oxidaci luminolu a podobných látek (lofin, lucigenin); často se jednalo o nepřímá stanovení (zhášení nebo zesilování CL emise při oxidaci luminolu např. peroxidem vodíku). Vývoj se dnes zaměřuje i na hledání nových CL reakcí pro přímé CL stanovení, kdy dochází k oxidaci analytu silným oxidačním činidlem (např. manganistanem, komplexy trojmocného ruthenia nebo ceričitými ionty).

Emise chemiluminiscenčního záření je obvykle velmi krátkodobým jevem, doprovázejícím rychlé chemické reakce. Proto je žádoucí, aby při CL stanovení docházelo k vlastní CL reakci analytu s činidlem co nejbližší detektoru. Přínosem kombinace technik FIA a SIA s CL detekcí je skutečnost, že v průtokových systémech lze činidla se vzorkem smístit velmi rychle a reprodukovatelně a prakticky okamžitě dopravit lumineskující zónu do detektoru. Průtokové metody s CL detekcí umožňují tedy účinně řešit problém zajištění rychlého, citlivého a relativně selektivního automatizovaného stanovení nízkých koncentrací analytů ve středně složitých matricích, což je často případem při stanovení obsahu účinné látky ve farmaceutickém přípravku nebo při monitorování změn koncentrace účinné látky např. v disolučních testech.

Tato disertační práce se věnuje problematice chemiluminiscenčního stanovení farmaceuticky významných nebo biologicky účinných látek automatizovanými průtokovými metodami (průtoková injekční analýza, FIA a sekvenční injekční analýza, SIA). Práce je koncipována jako soubor publikovaných článků s řešenou tematikou a rukopisů připravených k publikaci, doplněný příslušnou teoretickou částí a shrnujícími komentáři.

2 Cíl práce

Cíle práce lze rozdělit na několik úkolů. První z nich byl zaměřen na zpracování rešerše, která se bude zabývat metodami chemiluminiscenčního stanovení farmaceuticky významných látek pomocí průtokové a sekvenční injekční analýzy publikovanými od roku 2001. Tento úkol navazuje na rešeršní práci s podobným tématem, kde byly zpracovány publikace uveřejněné v období 1997 - 2000 [6].

V úvodu experimentální práce byly vytipovány vhodné farmaceutické látky pro chemiluminiscenční SIA stanovení. U vybraných léčiv verapamilu a indometacinu vykazujících v reakci s komplexem trojmocného ruthenia (2,2'-bipyridylruthenium(III)) vysoký výtěžek CL bylo cílem vyvinout novou citlivou metodu, která bude aplikována na analýzu komerčního přípravku.

Při optimalizaci metod farmaceutické analýzy byl sledován vliv pufrů a rozpouštědel na chemiluminiscenční odezvu. Studium rozpouštědel převážně ze skupiny alkoholů si kladlo za cíl otestovat vliv přídavku dosud nepoužívaných rozpouštědel na výtěžnost chemiluminiscenční reakce komplexu ruthenia a manganistanu s verapamilem resp. endralazinem.

V rámci vývoje průtokových metod bylo dalším cílem navrhnout multikomutační metodu chemiluminiscenčního stanovení pesticidu chlorsulfuronu. Chemiluminiscenční reakce byla založena na oxidaci fotodegradačních produktů pesticidu (které byly získány on-line ozařováním roztoku analytu UV lampou přímo v průtokovém systému) manganistanem draselným v kyselině sírové.

Sekvenční injekční analýzu lze využít jako nástroj automatizace testování kvality finálního farmaceutického přípravku. Snahou bylo vytvořit plně automatizovaný SIA systém pro sledování uvolňování účinné látky z polotuhých léčivých přípravků přes membránu modelující lidskou kůži, který by splňoval regulační požadavky (FDA). Tato práce byla součástí projektu J. Klimundové a navazovala na vývoj SIA analyzátoru pro stanovení liberačního profilu mastí obsahujících kyselinu salicylovou [7]. Úkolem projektu bylo začlenění několika Franzových cel do SIA systému pro simultánní sledování uvolňování účinné látky z mastí z několika vzorků dle požadavků FDA.

3 Teoretická část

3.1 Rozdělení a charakteristika průtokových metod

3.1.1 Automatizace analytických metod

Stanovení koncentrace látky vyžaduje v praxi navržení přesné, správné a rychlé analýzy. Člověk vnáší do své práce kromě inovace a know-how i velkou míru nepřesnosti a možnosti chybovat. Často záleží i na jeho psychickém stavu. Navíc, každý člověk pracuje s jinými zažitými návyky. Farmaceutický průmysl si nemůže takovou nejistotu dovolit. Přestože existují dopodrobna popsána SOP a práce analytika se musí řídit zásadami správné laboratorní praxe, lidská chyba může být významná. Vývoj analytické chemie se snaží reagovat na tyto požadavky praxe tím, že jsou manuální operace automatizovány.

Výhody automatizace oproti manuálně prováděným metodám tkví v odstranění lidského faktoru a tím zajištění přesného výsledku. Dalšími výhodami mohou být zvýšení produktivity analýz, tedy zpracování vysokého počtu vzorků a informací za kratší dobu, a snížení spotřeby činidel, které mají negativní vliv na životní prostředí. Zařízení diskutovaná v této práci jsou levná na rozdíl od v současnosti nejrozšířenější analytické techniky, kterou je HPLC.

Automatizované metody mohou být rozděleny podle způsobu provedení na diskrétní, robotické a průtokové [2, 3]. U diskrétních metod jsou vzorek a reagenty umístěny v určitých nádobkách (zkumavkách), jejichž obsahy jsou mechanicky, například odstředivou silou, smíchány, přemístěny do nádoby, kde je detektorem měřena analytická odezva. Robotické metody napodobují manuální práci člověka, jsou to tzv. počítačem kontrolované miniroboty. Využívají se zejména při manipulaci se zdraví škodlivými látkami jako jsou například radioaktivní materiály nebo karcinogenní látky. Průtokové metody jsou založené na dávkování vzorku a reagentů do nosného proudu (inertní nosný proud či roztok reagentů), který unáší vzorek nebo vznikající produkt analytické reakce k detektoru, kde je měřena analytická odezva.

Průtokové analytické metody jsou rozlišovány dle různých kritérií na metody s kontinuálním a diskontinuálním proudem nebo na separační a neseparační průtokové metody. Mezi klasické separační průtokové metody bychom zařadili metody chromatografické, kde při kontinuálním toku mobilní

fáze (kapalné - LC nebo plynné – GC) dochází na stacionární fázi k rozdělení směsi.

Moderní technikou řadící se k separačním metodám s diskontinuálním tokem je sekvenční injekční chromatografie (SIC) [8, 9] využívající separační kolony (př. monolitické), které kladou toku mobilní fáze menší odpor než běžné částicové kolony u HPLC. Takové kolony mohou pracovat ve spojení s nízkotlakými čerpadly. Odlišností u SIC oproti HPLC je například možnost změnit směr toku mobilní fáze (nosného proudu) během analýzy.

Neseparační průtokové metody představují jednoduchý způsob automatizace bez možností separace. Umožňují analýzu vysokého počtu vzorků a rozdělují se dle kontinuálnosti toku, viz kapitola 3.1.2.

3.1.2 Průtokové neseparační analytické metody

Průtokové neseparační analytické metody jsou založené na kontinuálním nebo diskontinuálním toku nosného proudu, do kterého je dávkován (injekčně nebo je aspirován) vzorek, případně i reagentie, a unášen směrem k detektoru, kde je měřen zvolený analytický signál. Tyto metody můžeme rozdělit na:

- segmentovanou průtokovou analýzu (SFA)
- techniky nesegmentované průtokové metody
 - kontinuální
 - průtoková injekční analýza (FIA)
 - multikomutační metoda
 - technika multi-syringe
 - μ TAS, lab-on-chip
 - diskontinuální
 - sekvenční injekční analýza (SIA)
(modifikace SIA: techniky lab-on-valve, bead injection)

Segmentovaná průtoková analýza (SFA) s kontinuálním tokem patří mezi nejstarší průtokové neseparační metody. Zde jsou sousední zóny vzorků po smíchání s činidlem odděleny vzduchovými bublinami, aby nedošlo k jejich vzájemnému znečištění [10]. Pro detekci je nutné dosažení reakční rovnováhy, což prodlužuje dobu analýzy (až 30 minut). Tato technika našla uplatnění v klinických a oceánografických laboratořích. Později byla postupně nahrazována průtokovými nesegmentovanými technikami, jako např. průtokovou injekční analýzou [11]. Výhodou nesegmentovaných metod je možnost odečítání analytického signálu, aniž by bylo dosaženo rovnovážného stavu reakce díky kontrolované parciální disperzi a vysoce reprodukovatelné době, kdy je tento signál snímán [11].

FIA analyzátor je rigidní systém. Například změna objemu vzorku vyžaduje manuální zásah do systému. Pružnost hadiček peristaltické pumpy se během času mění a je nutná jejich častá výměna. Tyto nedostatky FIA uspořádání vedly k vývoji modernější sekvenční injekční analýzy [12] označované jako druhá generace FIA. Vzorek a reagentie jsou do nosného proudu aspirovány přes vícecestný selekční ventil pomocí pístové pumpy

(vyjimečně peristaltické) a změnou směru toku jsou vzorek nebo vznikající produkt unášeny do detektoru.

Postupně od SFA přes FIA a SIA dochází ke snižování objemu vzorku. U SFA bylo zapotřebí až 2 ml vzorku, u FIA to jsou už maximálně stovky μl a u SIA desítky μl .

Další techniky jako multikomutační metoda [13] a metoda s více pístovými pumpami (MSFIA) [11] jsou odvozeny od techniky FIA. Multikomutační metoda představuje obměnu metody FIA. U multikomutační metody jsou do klasického FIA systému zařazeny solenoidní ventily umožňující snadnější přepínání nosného proudu a činidel ve vícekanálových systémech.

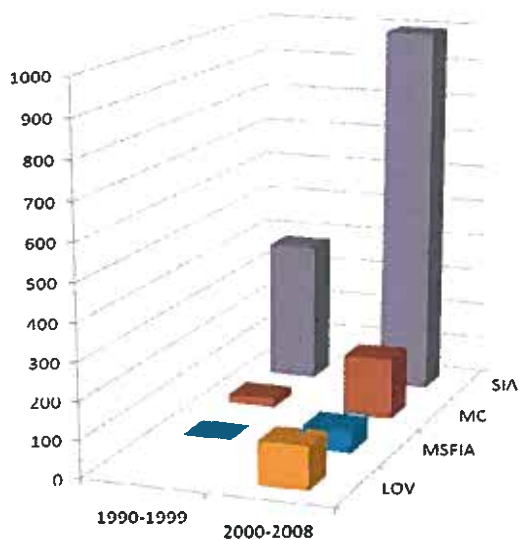
Rozšiřování aplikace průtokových neseparačních metod přineslo potřebu vytvořit takové zařízení, které by umožnilo analýzu vzorku přímo v místě odběru. Snahou bylo zmenšit přístrojové vybavení systémů s kontinuálním jednosměrným tokem (na této bázi pracuje většina zařízení μTAS – mikroanalytický systém, systém lab-on-chip) i miniaturizaci hardware u SIA (Lab-on-valve – LOV, označovaný jako třetí generace FIA) [14, 15]. Tyto systémy byly aplikovány například při analýze životního prostředí a v bioanalýze (analýza DNA, klinické analýzy, imunotesty). Srdcem systému LOV je nejčastěji šesticestný selekční ventil, pohonnou jednotkou je pístová pumpa s objemem 500 μl , která aspiruje vzorek a případné reagenty do mísící/reakční cívky. Změnou toku dochází k přesunu vzorku/produktu chemické reakce do víceúčelové průtokové cely integrované se selekčním ventilem. U spektrofotometrické nebo fluorimetrické detekce je průtoková cela propojena s příslušným detektorem pomocí optických vláken.

Principem techniky „bead injection“ je manipulace s mikročásticemi, které jsou vpraveny do průtokového systému LOV a ve vybraném místě zachyceny. Následně je přes tyto mikročástice injekčně vpraven vzorek, přičemž analyt reaguje s funkčními skupinami na povrchu částic. Zachycené molekuly analytu jsou buď přímo detekovány spektrofotometricky nebo jsou z mikrosfér vymyty do detektoru. Na konci cyklu je povrch mikročástic regenerován nebo jsou částice úplně odstraněny [16].

V grafech 1, 2 je přehled četnosti publikací popisující vybrané neseparační nesegmentované metody. Z přehledu je patrný rostoucí zájem automatizace chemické analýzy pomocí průtokových metod.

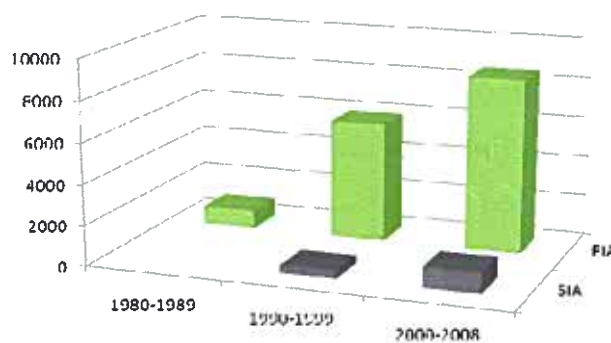
Graf 1.

Publikace SIA, MC, MSFIA, LOV



Graf 2.

Publikace FIA, SIA

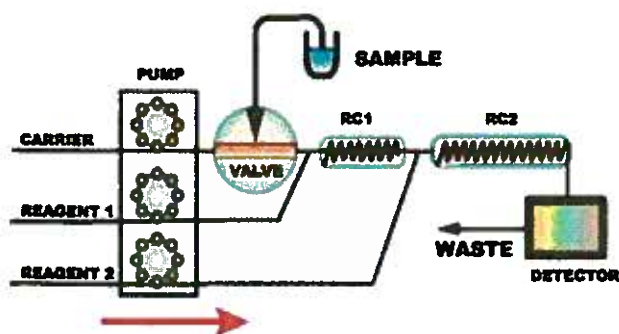


Četnost publikací (osa y) v databázi *Web of science* (www.isiknowledge.com) v desetiletích (osa x) obsahující slovní spojení – *sequential injection analysis* (v grafu SIA); *flow injection analysis* (v grafu FIA); *lab-on-valve* (v grafu LOV); *multisyringe* (v grafu MSFIA) a *multicommuation* (v grafu MC). Data do 31.prosince 2008.

3.1.3 Průtoková injekční analýza

Průtoková injekční analýza (FIA, 1975 J. Růžička a E.H. Hansen [1]) je založená na dávkování vzorku pomocí dvupolohového dávkovacího ventilu do kontinuálního toku. Nosný proud odnáší zónu vzorku do detekční (průtokové) cely [3], kde je měřena analytická odezva. Vzorek se po nadávkování postupně rozmývá, jak je unášen do detekční cely. Disperze je částečná (parciální), není dosažena rovnováha. Pro praktické vyjádření se v tomto případě používá koeficient disperze D [10], který je dán poměrem koncentrace vzorku před nadávkováním a koncentrací vzorku v určitém místě FIA systému. Tento parametr charakterizuje analytický signál, který je nestálý, jak je produkt/vzorek nesen a snímán stacionárním detektorem (charakterizuje průchod vzorku systémem hadiček). Malý koeficient disperze je typický pro systém bez chemické reakce, s krátkou vzdáleností mezi detektorem a dávkovací jednotkou a s vysokou průtokovou rychlostí, kdy vzniká ostrý pík [2]. Díky reprodukovatelnému průběhu celé analýzy je zajištěna dostatečná opakovatelnost i bez dosažení rovnováhy reakce.

Obrázek 1. Schéma FIA analyzátoru



CARRIER – nosný proud; DETECTOR – detektor; PUMP – peristaltické čerpadlo; RC1, RC2 – reakční nebo mísící cívky; REAGENT 1, 2 – reakční činidla 1, 2; SAMPLE – vzorek; VALVE - dvupolohový ventil; WASTE - odpad.

Schéma FIA analyzátoru je uvedeno na obrázku 1. Pohonnou jednotkou ve FIA systému je nejčastěji peristaltická pumpa, která vytlačuje nosný proud a reagentie přes hadičky do systému. Vzorek může být dávkován ručně nebo automaticky dvupolohovým dávkovacím ventilem. Objem dávkovací smyčky udává objem vzorku a tudíž změna objemu vzorku je spojená s výměnou

smyčky. Pro dokonalejší promísení a průběh reakce mohou být v systému ještě mísící/reakční cívky. Analytická odezva je měřena v průtokové cele, která je součástí detektoru, a může mít různý tvar v závislosti na použité detekční metodě.

Nejvíce používanou detekcí ve FIA analýze je spektrofotometrie ve viditelné a UV oblasti. Časté spojení FIA je s luminiscenčními metodami jako fluorescence a chemiluminiscence. Obecně je možné zapojit do FIA systému jakýkoli detektor. V literatuře bylo popsáno spojení FIA s detekcí turbidimetrickou, nefelometrickou, atomovou absorpční, emisní a fluorescenční spektrometrií, elektrochemickými metodami (potenciometrií, amperometrií, voltametrií, konduktometrií), i dnes velmi populární hmotnostní spektrometrií. Geometrie průtokové cely se různí podle použité detekční metody [17].

FIA je aplikována v analýze vzorků životního prostředí. Nejčastějším objektem analýzy je přírodní nebo upravená pitná voda, dále odpady, aerosoly, rostlinné materiály, ale také složky potravy, které ovlivňují zdraví lidí a zvířat (např. konzervační látky). Metodou FIA jsou analyzovány nápoje (ovocné džusy, mléko, víno), kde je úprava vzorku před analýzou poměrně jednoduchá. Uplatnění našla FIA v biochemické analýze (enzymatické a biochemické senzory) a v chemické analýze látek přítomných v endogenních tekutinách (krev, plazma, moč) a tkáních. Analýza takových látek je složitá vzhledem k nízkým koncentracím a komplikovaným matricím, jež je často nutné před vlastní analýzou upravit [17, 18].

Přísná kontrola kvality při výrobě, distribuci a uchovávání farmaceutických přípravků jakož i kontrola terapeutických hladin léčiv, sledování biodostupnosti léčiva či kontrola užití nezákonných látek vyžaduje rutinní, rychlé a jednoduché metody analýzy. FIA je jednou z metod, která tato požadavky splňuje [17, 18].

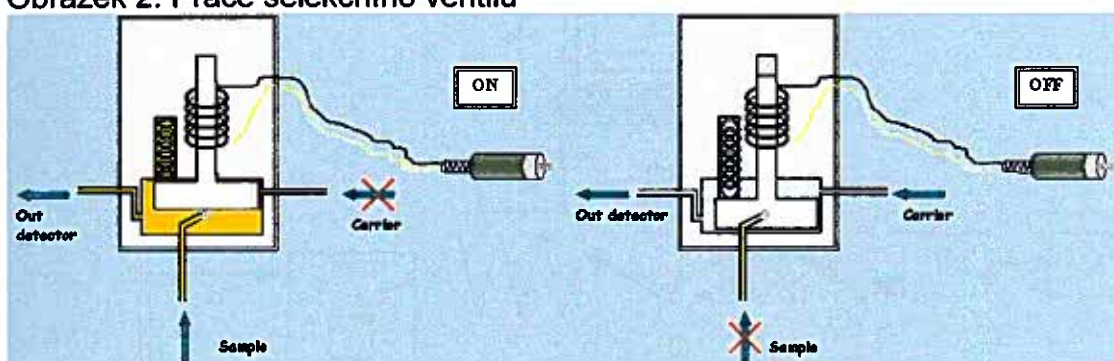
Pořizovací náklady FIA analyzátoru jsou nižší než u dnes běžně rozšířené HPLC, přičemž FIA je charakterizována dostatečnou mírou reprodukovatelnosti a spolehlivosti. Počet analýz za hodinu dosahuje i několik set (obvykle se ale pohybuje od 60 – 180) [1]. Přejít na stanovení jiného analytu však vyžaduje modifikaci sestavy FIA, která se bohužel neobejde bez zásahu lidské ruky.

3.1.4 Multikomutační metoda

Součástí disertační práce je v experimentální části uveden vývoj metody automatizované pomocí multikomutační metody. Tato průtoková metoda je rozvíjena španělskými a portugalskými výzkumnými týmy.

Multikomutační metoda vychází ze základů FIA a je založena na řízení toku pomocí malých trojcestných solenoidních ventilů (obrázek 2). Objemy vzorku a reagensů závisí na době otevření solenoidního ventilu, který má 2 polohy, ON a OFF. V multikomutačním zařízení bývá zapojeno více takových ventilů pracujících nezávisle na sobě.

Obrázek 2. Práce selekčního ventilu



Dvě polohy selekčního ventilu: ON – vzorek protéká do systému; OFF – tok je přesměrován ze vzorku na nosný proud

Protože solenoidní ventily jsou řízeny elektrickým impulsem (obvykle 12 V a 100 mA), je možné jednoduché ovládání přesměrování toku zautomatizovat počítačem, čímž se i zvyšuje reprodukovatelnost analýz (omezení lidského faktoru). Další výhodou oproti FIA je větší flexibilita. Objemy vzorku a činidel jsou závislé na čase, po který je ventil otevřen a ne na objemu dávkovací smyčky jako u FIA.

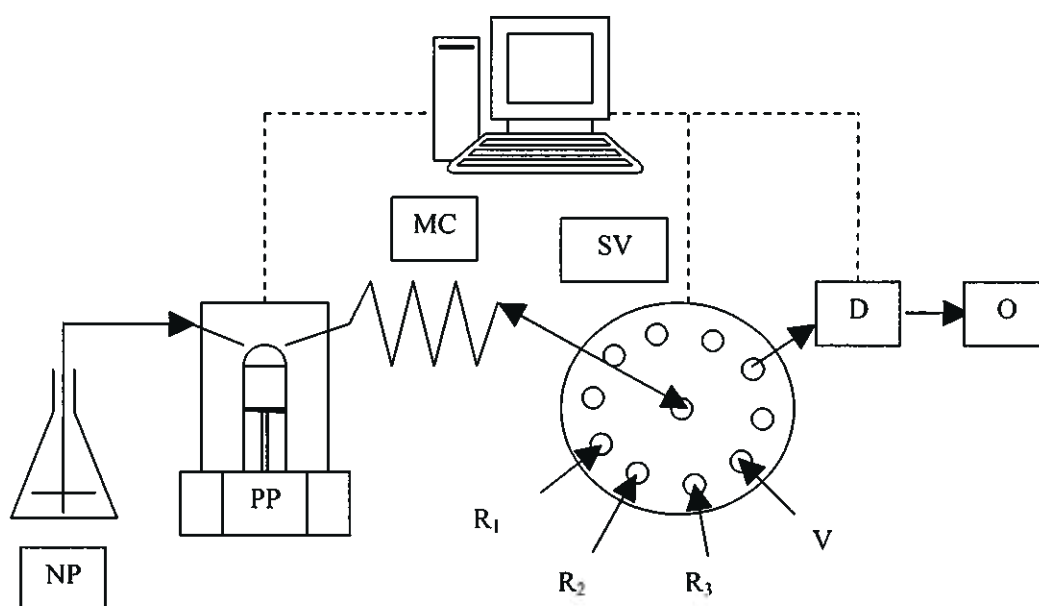
U multikomutačních metod je výhodnější umístit pohonnou jednotku (například peristaltickou nebo solenoidní pumpu, pomocí které jsou vzorek a činidla nasávány) za ventily. Nasáváním velmi malých objemů se při použití peristaltické pumpy snižuje reprodukovatelnost.

Tato metoda nachází uplatnění hlavně v analýze vod a rostlinných materiálů. Nejčastějšími detektory jsou optické (spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti, chemiluminiscence, fluorescence, atomová absorpční spektrometrie) a elektrochemické detektory [13, 19].

3.1.5 Sekvenční injekční analýza

Sekvenční injekční analýza (1990, J. Růžička, G. Marshall) patří do neseparačních průtokových metod a je založena na podobných principech jako FIA. Vzorek podléhá kontrolované parciální disperzi, analytická odezva je obvykle měřena před dosažením rovnováhy reakce. Tok nosného proudu je nesegmentovaný, ale diskontinuální, je možné jeho přesměrování, což usnadňuje použití různých metod bez změny geometrie zařízení [12].

Obrázek 3. Struktura SIA zařízení



NP: nosný proud (nejčastěji voda); PP: pístová pumpa; MC: mísící/reakční cívka; SV: selekční ventil (na obrázku deseticestný); D: detektor; O: odpad; R₁₋₃: roztoky činidel; V: vzorek.

Na obrázku 3 je znázorněno obecné schéma SIA systému. Srdcem SIA zařízení je vícecestný selekční ventil, který je schopný synchronně pracovat s pohonnou jednotkou, což je nejčastěji pístová pumpa s krokovým motorem. Je přesnější než peristaltická, ale má omezený objem, většinou 5 ml. Synchronní práce pumpy a selekčního ventilu vyžaduje ovládání počítačem, čímž je dosaženo úplné automatizace. Vzorek je aspirován pomocí pumpy do systému přes jeden port selekčního ventilu, podobně jsou nasávána i další činidla nutná pro reakci. V hadičce zóny přiléhají těsně k sobě, tvoří tzv. sekvenci (odtud sekvenční injekční analýza). Mezi pístovou pumpou a ventilem

je umístěna cívka, ve které dochází k mísení zón vzorku a činidel. Zároveň tato cívka zabraňuje vniknutí činidel a vzorku do vnitřního prostoru pístové pumpy. Po změně směru toku je produkt unášen do detektoru (obrázek 4).

Obrázek 4. Schéma toku v sekvenční injekční analýze [16]



A: dávkování činidla/vzorku; B: sekvence nadávkovaných zón; C: změna směru toku, reakce, vznik produktu; D: dekekce produktu

Do SIA systému můžeme zapojit kterýkoli detektor podobně jako u FIA. Nejrozšířenější jsou optické detektory (UV a viditelná detekce, fluorescence, chemiluminiscence, atomová absorpční a emisní spektrometrie) dále elektrochemické detektory (voltametrie, potenciometrie, amperometrie).

Oblasti aplikace SIA zahrnují analýzu životního prostředí, farmaceutickou a biomedicínskou analýzu, analýzu potravin, monitorování bioprocusů a imonutesty.

V SIA se průtokové rychlosti prakticky neliší od FIA a pohybují se okolo 1 až 5 ml/min. Doba trvání jednoho měřicího cyklu v SIA většinou nepřesahuje 30 s, což je srovnatelné s frekvencí dávkování ve FIA [20]. Díky několika volným polohám selekčního ventilu lze zapojit do SIA systému různé doplňkové moduly (jednotky pro kapalinovou extrakci, dialýzu, difúzi plynů).

Zavedením SIA se podstatně snižuje spotřeba vzorku a činidel (u FIA se obvykle jedná o kontinuální čerpání nosného proudu i činidel), což je v souladu s dnešním trendem snižovat zatěžování životního prostředí [21]. Další výhodou a odlišností od FIA je již dříve popsany způsob dávkování. Objem vzorku dávkovaného v SIA je dán časem, po který je otevřen příslušný port selekčního ventilu. U FIA závisí na objemu dávkovací smyčky. Nutnost ovládnutí SIA zařízení počítačem, použití pístové pumpy s krokovým motorem a potřeba

sestavit kvalitní řídicí program zvyšují cenu zařízení, ale zároveň se vylepšuje reprodukovatelnost ve smyslu omezení vlivu lidského faktoru na provedení analýzy.

3.1.6 Současné trendy

Vlastní analýze často předchází úprava odebraného vzorku, kterou lze rovněž zautomatizovat s využitím koncepce FIA nebo SIA [22]. Technikou SIA jsou realizovány například ředění vzorku, ředění standardu, separační procesy jako difúze plynu a dialýza přes vhodnou separační membránu, extrakce na rozhraní kapalina-kapalina a kapalina-plyn.

Extrakce na rozhraní kapalina-kapalina probíhá na základě hydrofóbních interakcí na tenkém filmu, který pokrývá stěny teflonové hadičky (extrakční cívka). Organické rozpouštědlo, vodný roztok vzorku a eluční činidlo jsou postupně aspirovány teflonovou extrakční cívkou. Organické rozpouštědlo vytváří tenký film na povrchu hadiček a díky rozdílným rychlostem toku jednotlivých fází dochází k extrakci. Extrahovaný vzorek je následně vymyt elučním roztokem [22].

K extrakci na pevnou fázi jsou využívány materiály jako iontoměničové pryskyřice, MIP, RAM [23] a různé hydrofobní polymery. Roztok vzorku prochází minikolonou, která je naplněna vhodným sorbentem; zde je analyt selektivně zachycen, zakoncentrován a poté eluován vhodným rozpouštědlem pro následnou detekci.

Neseparačními průtokovými metodami lze ve vzorku v jediném analytickém cyklu obvykle stanovit pouze jeden analyt. Zařazením chromatografických monolitických kolonek do systému SIA vzniká nový typ analyzátoru umožňující na chromatografickém principu stanovit současně několik analytů. Tato technika je označována jako sekvenční injekční chromatografie (SIC). Kromě klasických výhod SIA (nízké spotřeby vzorku a činidel, miniaturizace, automatizace) se SIC liší od HPLC programovatelným tokem a možností další automatické manipulace se vzorkem [8, 9].

Pro analýzu některých vzorků (např. z oblastí životního prostředí, monitoringu bioprosesů) je nutné provést analýzu v místě odběru s malým objemem vzorku. Proto je dalším trendem miniaturizace analytického systému (přenosné analyzátoři) na bázi FIA (lab-on-chip, μ TAS), SIA (lab-on-valve).

Pomocí moderních průtokových metod FIA a SIA je možné zautomatizovat testy kontroly kvality finálního farmaceutického přípravku jako

disoluční testy [24-26], studie liberačního profilu [27] (zapojení Franzových cel do SIA systému), testování biodostupnosti léčiv [28].

3.2 Luminiscenční metody

Luminiscenční metody se řadí mezi optické metody. Částice hmoty je excitována absorpcí energie a přechází ze základního stavu do excitovaného. Při přechodu částice zpět do základního stavu je uvolňováno záření v oblasti viditelného světla, UV nebo blízké infračervené oblasti. Částicemi, které emitují záření, mohou být volné atomy i molekuly. Tato kapitola se bude zabývat problematikou luminiscence molekul. Na bázi luminiscence atomů je založena např. metoda atomové fluorescenční spektroskopie. Mechanismus deaktivace molekul bývá složitější, a to především v důsledku vibračních deaktivací nezářivé povahy [29].

Luminiscence je obecně definována jako studené emisní záření. Dle způsobu excitačního procesu můžeme luminiscenční procesy třídit (shrnutí v tabulce 1). Mnoho z těchto jevů bylo pozorováno a popsáno v historii, např. chemiluminiscenci popisoval již Aristoteles. Fluorescenční analýza byla prakticky využívána až v druhé polovině 19. století, chemiluminiscenční analýza až v druhé polovině 20. století [30].

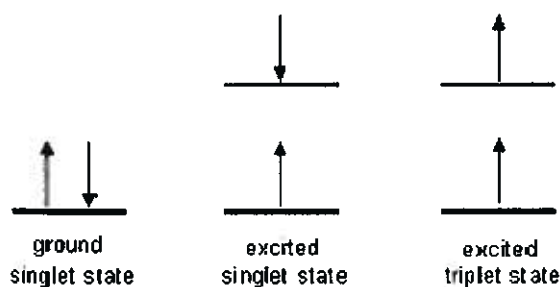
Tabulka 1. Přehled luminiscenčních jevů [4]

Klasifikace luminiscenčních jevů	Způsob excitace
Fotoluminiscence (fluorescence a fosforescence)	UV zářením, v oblasti viditelného světla nebo v blízké infračervené oblasti
Katodoluminiscence	β -částicemi
Anodoluminiscence	α -částicemi
Radioluminiscence	γ -částicemi nebo paprsky X
Kandoluminiscence	teplem, emise z hornin rozžhavených do běla
Termoluminiscence	teplem, emise ze středně horkých hornin a krystalů
Pyroluminiscence	teplem, emise z atomů kovů v plameni
Triboluminiscence	mechanická excitace
Krystaloluminiscence	krystalizací
Lyoluminiscence	při rozpouštění krystalů
Elektroluminiscence	elektrickým výbojem
Galvanoluminiscence	během elektrolýzy
Sonoluminiscence	pomocí ultrazvuku (roztoky)

Bioluminiscence	reakcí v živých organismech nebo biologických systémech
Chemiluminiscence	chemickou reakcí

Fotoluminiscenční metody se rozlišují na fluorescenci a fosforescenci. Způsob excitace absorpcí záření je u obou jevů stejný (tabulka 1). Obě metody jsou založeny na využití tzv. sekundárních emisních spekter v UV a viditelné oblasti, která vznikají zářivou deaktivací excitovaných molekul. Protože většinou dochází k ztrátě energie i nezářivým procesem (srážková deaktivace), vlnová délka emitovaného záření je delší než excitovaného záření (nerezonanční fluorescence). Fosforescence se od fluorescence liší delším časovým intervalem mezi ozářením a ukončením emise [29]. Spin excitovaného elektronu může být obrácen, molekula se nachází v tzv. tripletovém stavu (obrázek 5). Přechod do základního stavu probíhá pomalu, což je typické pro fosforescenci. Tento stav má nižší energii než excitovaný singletový stav charakteristický pro fluorescenci a fosforescenční spektra jsou posunuta k vyšším vlnovým délkám než u fluorescenčních. Doba existence excitovaného tripletového stavu může dosáhnout i několika sekund. Pro porovnání u singletového stavu (fluorescence) je doba existence $10^{-5} - 10^{-8}$ s [31].

Obrázek 5. Spin elektronů při singletovém a tripletovém stavu [31]



V analytické praxi má fosforimetrie zatím vzhledem k náročné přístrojové technice podružný význam [29].

3.2.1 Fluorescence

Tato fotoluminiscenční technika je založena na excitaci molekul UV, viditelným zářením nebo zářením v blízké infračervené oblasti. Při návratu zpět do základního stavu dochází k vyzáření energie v téže oblasti. Excitovaná molekula se nachází v singletovém stavu a doba konverze na základní hladinu je relativně krátká, nastává téměř okamžitě. Pokud emitované záření má stejnou vlnovou délku jako budící záření, mluvíme o rezonanční fluorescenci vyskytující se pouze u nejjednodušších dvouatomových molekul. U ostatních molekul se uplatňují nezářivé deaktivací procesy, které jsou spojeny s vnitřní konverzí (změna vibrace molekuly) a vnější konverzí molekuly (předání energie srážkami excitovaných molekul), což lze omezit ochlazením ve prospěch zářivé deaktivace [29].

U fluorescence rozlišujeme 2 typy spekter: excitační a emisní. Excitační spektrum je závislost intenzity fluorescence (měřené při konstantní vlnové délce) na vlnové délce excitujícího záření. Emisní spektrum je závislost intenzity fluorescence na jeho vlnové délce při konstantní vlnové délce excitujícího záření. Emisní pásy se většinou jeví jako zrcadlový obraz pásů absorpčních. Fluorescenční spektra lze pozorovat u látek snadno elektronicky excitovatelných (systém s π orbitaly) [29].

Fotoluminiscenční spektra našla uplatnění při identifikaci a při řešení struktur molekul (rozlišení polohových a prostorových izomerů). Fluorimetricky lze stanovit řadu látek a to jak anorganických tak především organických se systémem konjugovaných dvojných vazeb. Velkou výhodou je vysoká citlivost takovýchto stanovení. Signál je značně závislý na přítomnosti vedlejších látek v matrici. Při stanovení je nutná individuální kalibrační křivka na základě matrice vzorku [29]. Fluorescence se s výhodou uplatňuje v průtokových systémech, ale u složitějších matric je nutné zvýšit selektivitu stanovení separací.

3.2.2 Principy chemiluminiscence

Chemiluminiscence (CL) je založená na emisi záření, která je vyvolána chemickou reakcí. Pokud taková emise vychází z živých organismů nebo chemických systémů odvozených od živých organismů, nazývá se bioluminiscence. Jev chemiluminiscence zaznamenává své analytické využití teprve od druhé poloviny 20. století [5]. Za tu dobu se stala chemiluminiscence významnou detekční technikou v mnoha oblastech a ve spojení s různými technikami.

CL je definovaná jako emise elektromagnetického záření v oblasti viditelného (nejčastěji), ultrafialového a blízkého infračerveného spektra v průběhu chemické reakce. Intenzita CL není konstantní, ale mění se s časem. V průběhu reakce se jeden z reakčních produktů dostává do elektronicky excitovaného stavu a při návratu na základní hladinu dochází k vyzáření světla. Protože je intenzita emise funkcí koncentrace látek účastnících se CL reakce, měření intenzity může být analyticky využitelné [4].

Pro chemiluminiscenční reakci musí být splněny některé podmínky. Za prvé reakce musí být exotermická. Průběh reakce musí být příznivý k tvorbě elektronicky excitovaného stavu. Deaktivační proces musí alespoň z části probíhat formou emise fotonů (jinak je energie ztracena ve formě jiných deaktivačních procesů, jako jsou uvolnění tepla, přeměna na vibrační, rotační energii,...). Chemiluminiscenční reakce jsou většinou založené na výměně elektronů, dochází k oxidaci nebo redukci stanovované látky nebo činidla.

Intenzita CL emise závisí na účinnosti vzniku elektronicky excitovaného stavu (*quantum yield*). Tato účinnost je obvykle velmi nízká. Vyšších hodnot účinnosti bývá obvykle dosaženo u bioluminiscence. Většina CL reakcí má účinnost malou [4], přesto je možné je analyticky využít. CL závisí nejenom na struktuře látky, ale i na jiných podmínkách a substrátech účastnících se reakce jako jsou katalyzátory, teplota, pH a iontová síla a dielektrická konstanta rozpouštědla.

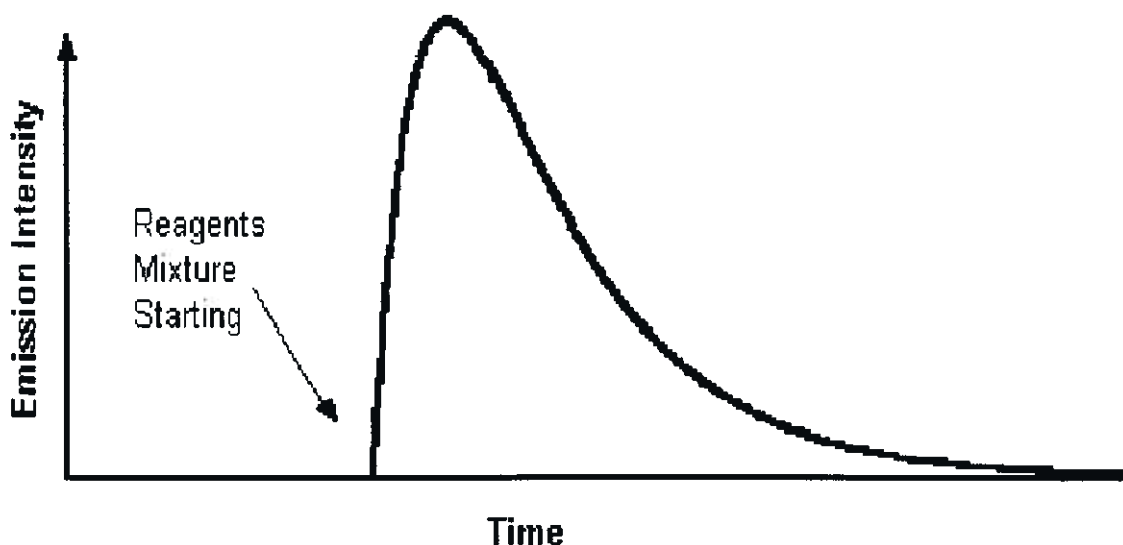
Na rozdíl od jiných optických metod včetně fluorescence je pro chemiluminiscenční metody charakteristická absence primárního zdroje záření.

Díky tomu je analytický signál zatížen relativně nízkým šumem a u CL metod je dosahováno velmi nízkých limitů detekce. Uvádí se, že CL analýza je asi 10^5 krát citlivější než spektrofotometrie a 10^3 krát citlivější než fluorimetrie [5]. Další výhodou CL bývá široký lineární rozsah stanovitelných koncentrací analytu. Nevýhodou je značná závislost CL na reakčních podmínkách a nepříliš vysoká selektivita. S jedním chemiluminiscenčním činidlem může reagovat více látek podobné struktury za emise CL. Tento nedostatek lze kompenzovat spojením CL se separačními metodami jako je například HPLC a kapilární elektroforéza [32]. V těchto případech se používá postkolonová CL detekce.

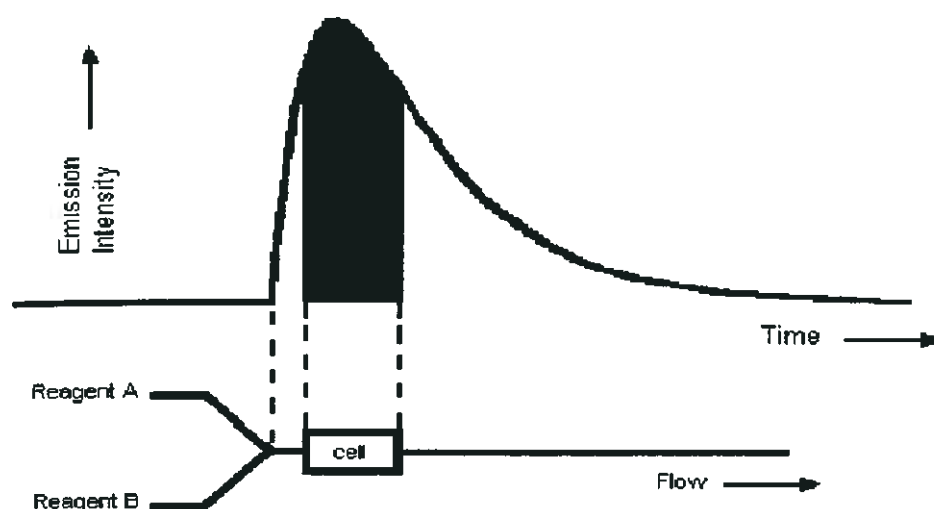
Chemiluminiscenční detekční zařízení může být velmi jednoduché, např. fluorimetr s vypnutým zdrojem primárního záření a citlivým fotonásobičem.

CL je silně závislá na čase (obrázek 6) a tato závislost se u různých reakcí liší. Může se projevit jako krátký záblesk, který ihned vyhasíná, nebo déletrvající emise světla. Většinou má ale rychlý průběh. Kritickým prvkem při vývoji průtokové metody s CL detekcí je vzdálenost bodu mísení vzorku s činidly od detektoru a celková průtoková rychlost. Na obrázku 7 je zachyceno obvyklé geometrické uspořádání mísícího místa a detektoru.

Obrázek 6. Časový průběh intenzity CL reakce



Obrázek 7. Poloha průtokové cely a časová křivka intenzity CL



Černě vyznačená oblast pod křivkou intenzity chemiluminiscence značí detekovanou část záření.

Je otázkou, které látky budou schopny (např. při oxidaci) poskytovat chemiluminiscenci. Existuje empirické pravidlo: jestliže je látka nebo reakční produkt schopný fluorescence, při oxidaci této látky s vysokou pravděpodobností dojde k emisi CL záření. Avšak toto pravidlo má mnoho výjimek a proto je spolehlivá predikce CL na základě této úvahy prakticky nemožná [33].

V posledních letech byla uplatněna k predikci možnosti chemiluminiscenčního chování látek při reakci s běžnými oxidačními činidly matematická metoda „molekulové konektivity“. Byly již publikovány články zabývající se predikcí CL u léčiv a pesticidů (úspěšnost předpovědi byla 93%), u fenolů a polyfenolů (100 %) a u námelových alkaloidů [34-37].

Při měření chemiluminiscence manuálním způsobem (*batch metoda*) je vzorek vpraven vstříknutím do CL cely, která obsahuje mechanicky promíchávaný roztok vhodných reagentů. Cella je umístěna ve světelně izolovaném boxu těsně u okénka fotonásobiče. V tomto uspořádání je možno zaznamenat celý emisní profil CL reakce; jeho průběh však silně závisí na způsobu promíchávání reakční směsi. Nevýhodou batch metody je nízká produktivita analýz [4, 33]. U průtokových metod prakticky nelze zaznamenat

celý emisní profil CL reakce, ale díky známým vlastnostem FIA a SIA lze dosáhnout vysoké opakovatelnosti a snadné automatizace měření CL.

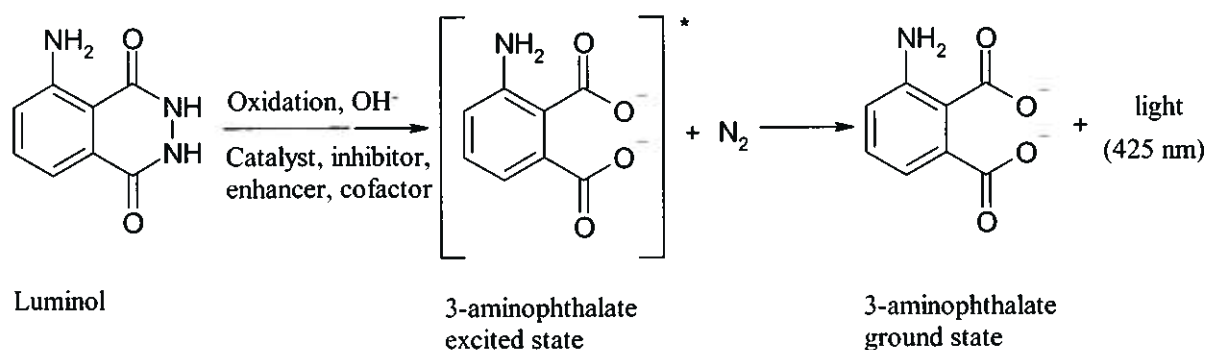
CL metody mohou být rozděleny podle povahy CL reakcí na metody přímé a nepřímé. U přímých metod je CL uvolňována v reakci analytu s oxidačním činidlem. Emitující částicí může být excitovaný reakční meziprodukt vzniklý z analytu nebo činidla nebo přidaný pomocný fluorofor (např. chinin nebo rhodamin B), který emituje CL záření po přijetí energie od meziproduktu. Nepřímé CL metody jsou založeny na známých CL reakcích luminolu, lofinu nebo lucigeninu s peroxidem vodíku. Analyt se zde CL reakce účastní nepřímo jako katalyzátor nebo inhibitor.

3.2.3 Nepřímé chemiluminiscenční metody

3.2.3.1 Reakce luminolu

Luminol (*o*-aminoftalylhydrazid) je oxidován v bazickém prostředí (pH 10-11). V průběhu reakce vzniká excitovaný meziprodukt 2-aminofthalát*, který při přechodu do základního stavu emituje přebytečnou energii v oblasti viditelného záření (425 nm). Oxidačními činidly jsou nejčastěji peroxid vodíku, manganistan, jodistan, N-bromosukcinimid, hexakynoželezitan. Schéma reakce je znázorněno na obrázku 8.

Obrázek 8. CL reakce luminolu



Tato reakce patří k nejnámějším reakcím, s nejvyšší účinností CL [4].

Analyt může hrát úlohu inhibitoru, katalyzátoru, kofaktoru nebo koenzymu (ionty kovů – Cu(II), Co(II), Fe(II), Fe(III)).

Na základě CL reakce luminolu byla stanovena oxidační činidla (přímé stanovení př. H_2O_2) [38]; enzymy, léčiva (viz. Příloha 1); a kovové ionty katalyzující tuto reakci (měď, kobalt, železo) [33]. CL reakce s luminolem se využívá též pro stanovení antioxidační aktivity [39]. Antioxidanty schopné vychytávat volné radikály kyslíku snižují CL odezvu při reakci luminolu.

3.2.3.2 Peroxyoxalátová reakce

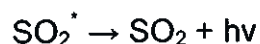
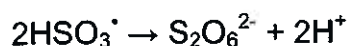
Arylesteroxalát, bis(2,4,6-trichlorofenyl)oxalát (TCFO) a bis(2,4-dinitrofenyl)oxalát (DNFO), je oxidován peroxidem vodíku a vzniká nestálý excitovaný meziprodukt peroxyoxalát. Přebytečnou energii lze přenést na jinou látku - fluorofor, který při přechodu do základního stavu vyzáří CL. TCFO je

stabilnější, ale reaguje pomaleji než DNFO. Oba substráty jsou ve vodě nerozpustné a podléhají hydrolyze. Po přidavku směsi organických rozpouštědel nebo tenzidů je možné stabilitu a rozpustnost zlepšit.

Tato reakce našla uplatnění pro stanovení peroxidu vodíku, fluorescenčních látek (porfyriny v moči, dipyridamol a benzydamin hydrochlorid v plazmě krys, flufenazin v moči a plazmě, fenoly) a pro stanovení látek po derivatizaci (aminokyseliny, karboxylové kyseliny, kabonyly, aminy – př. metamfetamin, catecholaminy – noradrenalin, adrenalin, dopamin, a další látky) [40].

3.2.3.3 Reakce siřičitanu

Při oxidaci siřičitanu silnými oxidačními činidly jako manganistanem nebo Ce(IV) v kyselém prostředí dochází ke slabé emisi chemiluminiscence, která může být ovlivněna některými látkami. Za emisi záření je pravděpodobně zodpovědný excitovaný stav oxidu siřičitého, jehož vznik je vysvětlován následujícím mechanismem:



Energie excitovaného oxidu siřičitého může být snadno předána vhodnému fluoroforu (analyzovaná látka). Tato reakce byla např. ve spojení se sekvenční injekční analýzou využita ke stanovení léčiv na bázi fluorochinolonu. Chemiluminiscence je zde zesilována ionty ze skupiny lanthanoidů [41].

3.2.3.4 Ostatní nepřímé CL reakce

Pro úplnost jsou zde uvedeny ještě další CL reakce, které však ve spojení s průtokovými metodami mají menší význam než předchozí CL systémy.

Reakce lofinu byla jednou z prvních studovaných chemiluminiscenčních reakcí (1877). Podstatou je oxidace lofinu např. směsí peroxidu vodíku a chlornanu nebo směsí peroxidu a hexakynoželezitanu. Reakce je katalyzována různými anorganickými ionty (AuCl_4^- , Co^{2+}). Emitované záření má žluté zbarvení.

Při reakci lucigeninu (oxidace např. peroxidem vodíku) v alkalickém prostředí se uvolňuje zelené CL záření. Reakční produkt je ve vodě špatně rozpustný. Pro omezení tvorby sraženiny se používá přídavek tenzidu. V průtokových metodách se tato reakce kvůli adsorpci reakčního produktu na stěny hadiček používá velmi zřídka [5].

3.2.4 Přímé CL reakce

Analyzovaná látka je oxidována středně silnými nebo silnými oxidačními činidly za uvolnění světelné energie. Nejběžnějšími oxidačními činidly jsou manganistan v kyselém prostředí, komplex tris[(2,2'-bipyridyl)]ruthenium(III) a Ce(IV) v kyselém prostředí.

3.2.4.1 Reakce manganu

Reakce manganistanu v kyselém prostředí je nejrozšířenější přímou chemiluminiscenční reakcí. V literatuře je možné nalézt mnoho výkladů, která částice je zodpovědná za emisi záření, např. excitovaný Mn(II), jeho komplexy, jednomocný kyslík nebo oxidační produkt analytu. Emitované CL záření má vlnovou délku 734 ± 5 nm či 689 ± 5 nm pokud je v reakční směsi přítomen hexametafosfát [42]. Většina autorů uvádí, že emitující částicí je s největší pravděpodobností Mn(II)* [43, 44]. Toto tvrzení vychází ze zjištěných skutečností: 1) spektrum emise je ve většině studií nezávislé na analyzované látce, 2) Mn(II) je prakticky vždy identifikován jako produkt reakce, 3) chemiluminiscence je podobná fosforescenci Mn(II) při nízkých teplotách a ve fosfátovém skle [44].

Podobně jako manganistan i sloučeniny manganu s nižším oxidačním stupněm Mn(IV) a Mn(III) mohou poskytovat chemiluminiscenci. Excitovanou částicí je zde pravděpodobně opět Mn(II)* [45, 46]. Tyto reakce se od CL reakcí manganistanu odlišují přípravou a stabilitou činidla a selektivitou. Mn(IV), který je znám ve formě nerozpustného MnO₂, může být připraven v rozpustné formě redukcí Mn(VII) za specifických podmínek. Případně lze MnO₂ imobilizovat na vhodném sorbentu umístěném v reakční cívce a tuto cívku začlenit do průtokového systému [45].

Kyselé prostředí při CL reakcích manganistanu vytváří nejčastěji kyselina sírová nebo kyselina polyfosforečná. V případě kyseliny polyfosforečné je popisována horší opakovatelnost CL měření ve srovnání s H₂SO₄ [44, 54].

Pro zvýšení citlivosti CL reakce manganistanu se používají jako zesilovače CL polyfosfáty (hexametafosfát sodný, polyfosforečná kyselina, pyrofosforečná kyselina), nízkomolekulární karbonylové sloučeniny (formaldehyd, kyselina mravenčí, glyoxal, glutaraldehyd) nebo tenzidy. U

polyfosfátů se předpokládá jejich stabilizační účinek na meziprodukty CL reakce (zvyšující se s délkou fosfátového řetězce) [44].

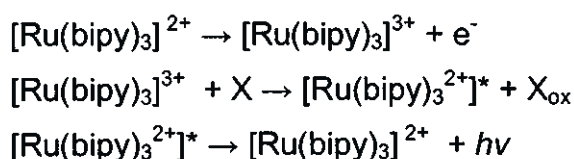
Některé tenzidy pravděpodobně chrání mikroprostředí v okolí emitující částice vytvořením micel nebo mohou přispívat k usnadnění přenosu excitované energie z jedné částice na vhodný fluorofor (částice zodpovědná za konečnou emisi záření). Některá rozpouštědla jako etanol, metanol, 2-propanol zvyšují výtěžek CL reakce. Jejich úloha není zcela zřejmá.

V literatuře lze nalézt využití CL reakce manganistanu v oblasti farmaceutické a klinické analýzy, analýzy vzorků životního prostředí a potravin [44].

3.2.4.2 Reakce komplexů ruthenia

Chemiluminiscence odvozená od reakce s komplexem ruthenia tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(III) byla popsána v roce 1966 [47]. Tento komplex není stálý a je nutné ho připravit těsně před CL reakcí ze stálejšího komplexu tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II). Způsoby přípravy komplexu trojmocného ruthenia jsou založeny na chemické, elektrochemické nebo fotochemické oxidaci komplexu dvojmocného ruthenia. Elektrochemická a chemická oxidace se používají častěji, zřejmě díky jednoduššímu provedení [48]. Nejčastěji je komplex ruthenia (II) oxidován ionty Ce (IV) nebo manganistanem v kyselém prostředí.

Při oxidaci analyzované látky komplexem tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(III) vzniká excitovaná částice tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)*, která je zodpovědná za emisi záření okolo 610 nm:



Do průtokového systému je buď přímo dávkováno čerstvě připravené činidlo trojmocného komplexu ruthenia, nebo je stabilní dvojmocný komplex v průtokovém analyzátoru oxidován online ionty Ce(IV). Komplex tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) může být ukotven na vhodném nosiči v koloně a takto zapojen do průtokového systému [48].

Většina látek poskytujících s komplexem tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(III) CL reakci obsahuje ve své struktuře aminový dusík (aminy, proteiny, alkaloidy). Z látek, které neobsahují dusík, jsou to oxaláty a některé karboxylové kyseliny [47, 48].

3.2.5 Bioluminiscence a elektrochemiluminiscence

Nejrozšířenější bioluminiscenční reakce je založená na systému luciferin-luciferasa získaném ze světlušek *Photinus pyralis* a mořských bakterií *Vibrio harvey* a *Photobacterium fisheri*. Enzym luciferasa katalyzuje oxidaci luciferinu za přítomnosti kyslíku a ATP. Vlastnosti reakce a vysoká nukleosidová specifita enzymu představují ideální analytický systém pro stanovení přítomnosti ATP, čím se prokazuje kontaminace mikroorganismy, potravinami a přítomnost lidských stop na povrchu materiálů [5].

Elektrochemiluminiscence (ECL) vzniká přímo nebo nepřímo jako výsledek elektrochemického děje. Reaktivní částice vytvořené elektrochemicky interagují buď mezi sebou nebo s jinými látkami v roztoku v blízkosti elektrody za uvolnění světelné energie. ECL je kontrolována potenciálem vloženým na pracovní elektrodu. Mezi výhody ECL patří snížení počtu a spotřeby reagensů, zvýšení selektivity a zjednodušení konstrukce průtokových metod, protože CL činidlo vzniká elektrochemicky. Elektroda může být součástí detekční cely, čímž je zajištěna maximální citlivost. Nestabilní CL činidla mohou být elektrochemicky připraveny in situ jako například trojmocný komplex ruthenia, případně mohou být CL reagensie elektrochemicky regenerovány [49].

3.2.6 Aplikace

S analytickým využitím chemiluminiscence se můžeme setkat v různých oborech. Pomocí chemiluminiscence byly stanoveny jak anorganické tak především organické látky.

V oblasti životního prostředí našla CL uplatnění při monitorování stavu životního prostředí, jako je kontrola koncentrace H_2O_2 a železa v mořské vodě i kontrola stavu ovzduší [50-52]. Díky citlivým CL metodám může být monitorována i velmi nízká hladina pesticidů v povrchových vodách a tím zkoumán jejich vliv na ekosystém [53, 54].

Další oblastí, kde se využívá CL jevu, jsou klinické a biomedicínské laboratoře (např. stanovení nukleových kyselin a imunoanalýza). Existují komerční kity a automatizované imunoanalýzátory pro testy in-vitro, které se používají pro rutinní analýzy v klinické chemii, imunologii, toxikologii, virologii a endokrinologii. Často se využívá značení pomocí akridiniumesterů a sulfonamidů (CL reakce s peroxidem vodíku), křenové peroxidázy (stanovení na bázi luminolu). CL se dále využívá ke stanovení specifických sekvencí DNA a RNA [55].

Vývoj chemiluminiscenčních metod ve farmaceutické analýze je orientován na stanovení hlavních účinných látek v léčivém přípravku, farmaceuticky aktivních látek přítomných v tělních tekutinách i tkáních. Chemiluminiscenční stanovení je spojováno především s průtokovými metodami (FIA, SIA, multikomutační metoda, multisyringe), méně s běžnými separačními metodami kapalinové chromatografie a kapilární elektroforézy [56]. CL reakce je při spojení s kapalinovou chromatografií realizována především jako post-kolonová. Nejčastějšími CL reakcemi, které byly popsány v literatuře ve spojení s HPLC jsou reakce s luminolem (stanovení katecholaminů v moči [57], stanovení amikacinu v plazmě a moči [58], stanovení glukokortikoidů v játrech [59]), reakce s komplexy ruthenia (stanovení fenothiazinových derivátů v moči [60], stanovení alkaloidů v máku [61]), peroxyoxalátové reakce [62], nebo reakce přímé (manganistan draselný [63]). Díky jednoduchému provedení CL detekce se uplatňuje i elektrochemiluminiscence [59, 60, 64].

S rozvojem průtokových neseparačních technik roste i zájem o CL detekci. Analýza léčiv ve středně složitých maticích jako jsou tablety a masti nevyžaduje v případě CL detekce téměř žádnou úpravu vzorku, protože pomocné látky přítomné v tabletách a masťovém základu obvykle neinterferují.

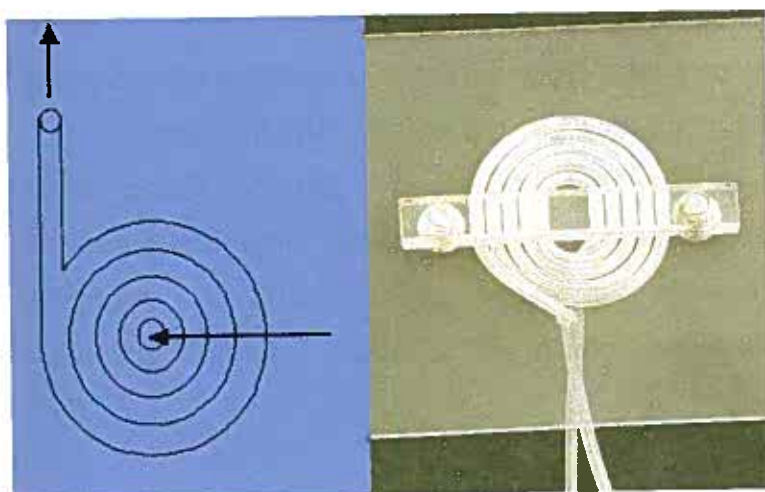
3.3 Spojení chemiluminiscence a průtokových metod

3.3.1 Přístrojové vybavení průtokové CL

Průtokový FIA či SIA systém s CL detekcí je sestaven z pohonné jednotky (peristaltická pumpa - FIA, pístová pumpa - SIA), mísící nebo reakční cívky, dvoupolohového (FIA) nebo vícecestného selekčního ventilu (SIA) a CL detektoru, přičemž jednotlivé části systému jsou propojeny teflonovými hadičkami. Tyto jednotky jsou obecně součástí průtokového systému bez ohledu na to jakou detekční techniku použijeme.

CL detektor se skládá z průtokové cely, krytu znemožňujícího průnik světla a vlastního detekčního systému. Tvar cely a její umístění vzhledem k detektoru má velký vliv na citlivost CL stanovení. Intenzita chemiluminiscence je přímo úměrná objemu cely. Nejpoužívanějším typem je plochá spirála na obrázku 9 umístěná těsně před oknem detektoru, aby k němu bylo vysláno co nejvíce fotonů. Světlo uvolněné v reakci z excitovaného meziproductu, který právě prochází detekční celou, dopadá na fotosenzitivní oblast detektoru. Světelná energie je přeměněna na elektrický signál, který může být zesílen a zaznamenán.

Obrázek 9. Schéma a fotografie chemiluminiscenční cely



Vzhledem k tomu, že CL reakce mají většinou velmi rychlý průběh, je žádoucí, aby bod, kde se mísí roztok analytu s činidlem, byl co nejbližší

chemiluminiscenční cely/detektoru. Materiál, ze kterého je cela vyrobena, musí být transparentní pro emitované světlo. Používají se cely ze skla, křemene, akrylátu, polyesterů nebo jiných plastů. Pro zvýšení citlivosti měření je možné použít pomocná planární nebo dutá zrcadla, která odrazí většinu paprsků směrem do detekčního okna PMT.

Základní detektor pro měření chemiluminiscence se nazývá luminometr. Luminometr většinou neobsahuje monochromátor, protože emitované světlo pochází obvykle z jediného druhu excitované částice a jiné složky matrice nereagují při stejných podmínkách za vyzáření světla.

Detektor musí splňovat tyto požadavky:

- Měl by umožňovat detekci světla o různé intenzitě (od několika fotonů za sekundu po desítky milionů fotonů za sekundu)
- Měl by být citlivý v co nejširší oblasti viditelného světla (380 – 750 nm) i více (částečně UV i IČ oblast). Většinou se citlivost detektoru mění s vlnovou délkou.
- Signál detektoru by měl být úměrný intenzitě emitovaného světla.
- Detektor musí zpracovat signál v co nejkratší době, rychlost snímání musí být vysoká, aby zachytil chemiluminiscenční pik. Tato podmínka je důležitá pro přesnost metody.

Nejpoužívanějšími detektory jsou fotonásobiče. Díky počítači lze analyzátor jednoduše ovládat, výstupy z detektoru rychle zpracovat a archivovat je [4, 5]. K monitorování intenzity CL je možno využít průtokový (HPLC) fluorescenční detektor s vypnutým excitačním zdrojem (UV lampou).

K ovládání SIA analyzátoru s CL detekcí a sběru a zpracování dat je nutno použít počítač. Vhodné ovládací programy nejsou zatím většinou komerčně dostupné. Některá výzkumná pracoviště si vytvořila vlastní software (program LabVIEW: Karlova Univerzita, Hradec Králové [65], Deakinova Univerzita, Geelong, Austrálie [66], Aristotelova Univerzita, Soluň, Řecko - FIA [67]).

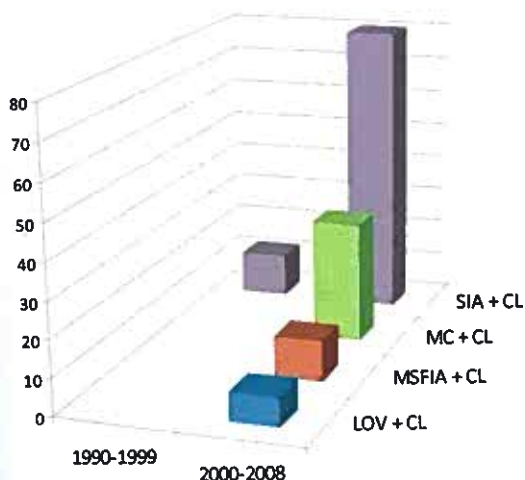
3.3.2 Chemiluminiscence a průtokové metody

Chemiluminiscence je často spojována se všemi moderními neseparačními průtokovými metodami. V grafu 3 a 4 je zobrazeno zastoupení publikací využívajících chemiluminiscenční detekci ve spojení s jednotlivými metodami.

Z rešerše (kapitola 4.2), která shrnuje CL analýzu léčiv pomocí sekvenční a průtokové injekční analýzy od roku 2001 do roku 2006, je zřejmá převaha publikací využívajících techniku FIA.

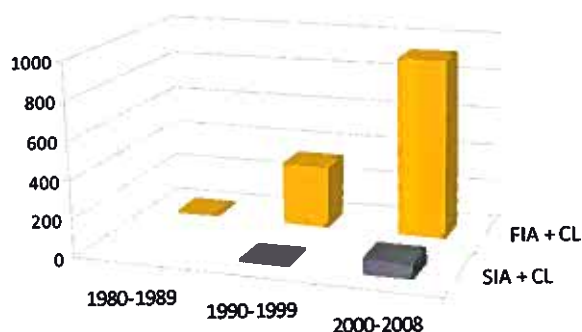
Graf 3.

Průtokové metody s CL detekcí



Graf 4.

Průtokové metody s CL detekcí



Četnost publikací (osa y) v databázi *Web of science* (www.isiknowledge.com) v desetiletích (osa x) obsahující slovní spojení *chemiluminescence* a – *sequential injection analysis*; *flow injection analysis*; *lab-on-valve*; *multisyringe* a *multicommutation*. Data do 31.prosince 2008.

Tabulka 2. Zastoupení průtokových metod s chemiluminiscenční detekcí

	FIA	SIA	MC	MSFIA	LOV
Bez rozdílu detekce (%)	90,0	7,9	1,1	0,4	0,6
CL detekce (%)	90,1	6,3	2,4	0,8	0,4

Grafy 1 – 4 a tabulka 2 ukazují přibližně stejné zastoupení průtokových metod bez rozdílu detekce a s CL detekcí.

Rozdíl FIA a SIA uspořádání pro chemiluminiscenční detekci je v technice mísení vzorku a činidla. Ve FIA je možné smístit toky vzorku a činidla velmi blízko detektoru, což je u rychlých reakcí žádoucí. U SIA jsou vzorek a činidlo aspirovány v sekvencích za sebou a změnou směru toku smíchány a přemístěny do detektoru. V SIA lze lépe ovládat rychlosti a přesnost dávkování pomocí krokového motoru. Nejprve jsou vzorek a činidla aspirovány pomalu, aby nedošlo k reakci, a pak jsou rychle přesunuty do detektoru. Pokud se vyskytuje u dané CL reakce určitá CL emise u slepého vzorku, u techniky FIA je možné slepý CL signál korigovat průběžně (nastavit nulovou linii) při průtoku činidel a čistého nosného proudu detektorem, kdežto u SIA je nutné provést analýzu slepého vzorku a vlastního vzorku zvlášť, aby byl získán skutečný signál analytu [1]. Naopak složitější systém s více reakčními činidly (např. reakce ruthenia s online generovaným aktivním činidlem) se snadněji realizuje pomocí SIA.

4 Výsledková část s komentáři k publikovaným pracím a rukopisům

V této kapitole je podán stručný komentář ke 4 publikovaným pracím a 2 rukopisům připraveným k publikaci. Úplný text všech prací je uveden v kapitole 5. Plné znění abstraktů prezentovaných na vědeckých konferencích je v kapitole 5.7.

4.1 Přehled publikovaných prací

Publikované práce:

1. K. Mervartová, M. Catalá Icardo, J. Martínez Calatayud, **A fully automated assembly using solenoid valves for the photodegradation and chemiluminometric determination of the herbicide Chlorsulfuron**, Anal. Lett. 38 (2005) 179 – 194, IF¹ = 1,362, Citace² 7x
2. J. Klimundová, K. Mervartová, H. Sklenářová, P. Solich, M. Polášek, **Automated sequential injection fluorimetric set-up for multiple release testing of topical formulation**, Anal. Chim. Acta 573-574 (2006) 366-370, IF¹ = 3,186, Citace² 0x
3. K. Mervartová, M. Polášek, J. Martínez Calatayud, **Recent applications of flow-injection and sequential-injection analysis techniques to chemiluminescence determination of pharmaceuticals**, J. Pharm. Biomed. Anal. 45 (2007) 367-381, IF¹ = 2,761, Citace² 6x
4. K. Mervartová, M. Polášek, J. Martínez Calatayud, **Sequential injection analysis (SIA) – chemiluminescence determination of indomethacin using tris[(2,2'-bipyridyl)]ruthenium(III) as reagent and its application to semisolid pharmaceutical dosage forms**, Anal. Chim. Acta 600 (2007) 114-121, IF¹ = 3,186, Citace² 1x

Přehled - plakátová sdělení a přednáška:

1. J. Klimundová, K. Mervartová, H. Sklenářová, P. Solich, **Automation of release tests of topical semisolid preparations based on sequential**

¹ Hodnota Impact Factor (IF) odvozená z citací za rok 2007

² Citování publikovaného článku jinými autory dle Web of Science ke dni 16.5.2009

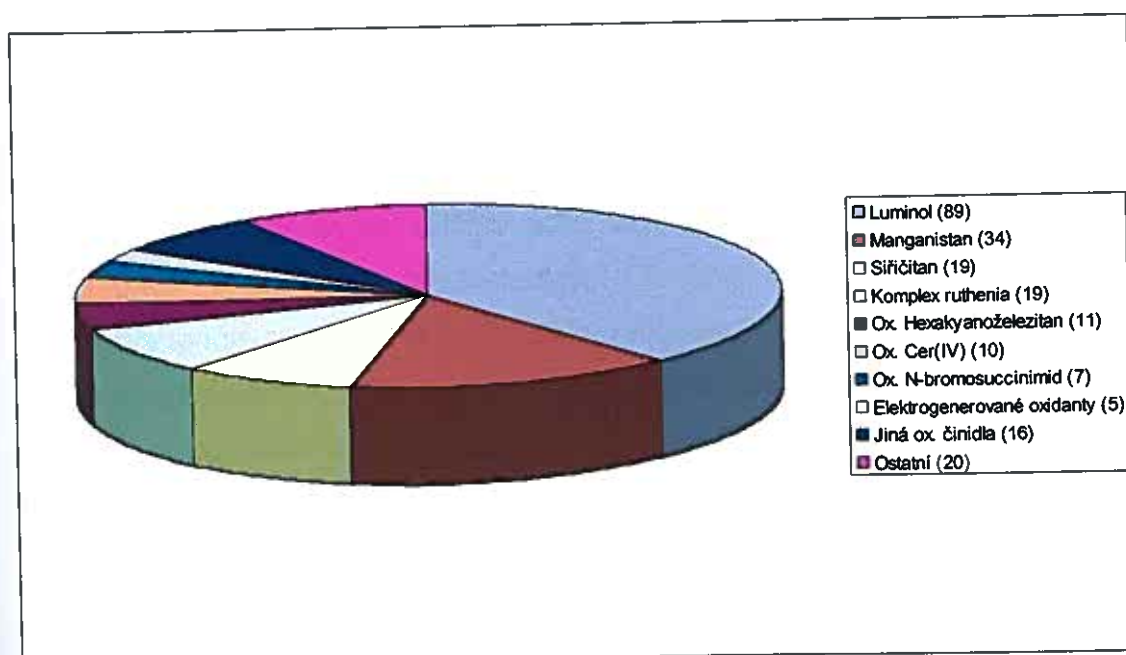
- injection analysis; 2. International Symposium on Scientific and Regulatory Aspects of Dissolution and Bioequivalence, Atény, 3.-5.6.2005**
2. K. Mervartová, D. Lopez, P. Holá, M. Polášek, **Vyhledávací studie léčiv poskytujících významnou chemiluminiscenci při oxidaci manganistanem a při reakci s komplexem $[\text{Ru}^{\text{III}}(2,2'\text{-bipyridin})_3]^{3+}$** , 34. *Syntéza a analýza léčiv*, Brno, 12.-14.9.2005, P57
 3. K. Mervartová, J. Klimundová, H. Sklenářová, M. Polášek, **Automatizace sledování liberace léčiv z mastí technikou sekvenční injekční analýzy**, 34. *Syntéza a analýza léčiv*, Brno, 12.-14.9.2005, P56
 4. K. Mervartová, J. Klimundová, H. Sklenářová, M. Polášek, **Automated SIA-fluorimetric method for release testing of topical formulations containing salicylic acid**, *Instrumental methods of analysis, modern trends and applications (IMA05)*, Kréta, 2.6.10.2005, P-II-70
 5. M. Polášek, H. Tomanová, K. Mervartová, P. Solich, **Rapid automated evaluation of antioxidation/free radical scavenging activity of natural substances by sequential injection technique (SIA) using chemiluminescence detection system based of Fe(III)-catalysed luminol – hydrogen peroxide reaction**, *International Chemical Congress of Pacific Basin Societies PACIFICHEM*, Honolulu, 15.-20.12.2005 Abstr. No. 678
 6. M. Polášek, M. Otapka, K. Mervartová, D. Lopez, **Fully automated SIMPLEX optimization of operational parameters (aspirated volumes, flow rates and delay times) in sequential injection analysis**, 13. *International Conference on Flow Injection Analysis including related techniques (ICFIA)*, Las Vegas, 24.29.4.2005, přednáška p.L-51
 7. K. Mervartová, M. Polášek, **SIA-chemiluminescence determination of indomethacin in pharmaceutical formulations**, 10. *International Conference on Flow Analysis*, Porto, 3.–8.9.2006, P149

8. K. Mervartová, M. Polášek, R. Hájková, H. Sklenářová, **SIA-automation of release tests according to recommended guidelines**, *Joint Meeting*, Marburg, 4.10–7.10.2006, A015
9. K. Mervartová, M. Polášek, **Influence of solvents on chemiluminescence reactions with permanganate and tris[(2,2'-bipyridyl)]ruthenium(III) studied in sequential injection analysis**, *14. International Conference on Flow Injection Analysis (ICFIA)*, Berlín, 2.9.-7.9.2007, P74
10. J. Smutek, M. Polášek, K. Mervartová, **LabVIEW® -based "SIAMPLEX" software for fully automated optimization of computer-controlled operational parameters in SIA with chemiluminescence, fluorescence or absorption spectrophotometric multi-channel detection**, *14. International Conference on Flow Injection Analysis (ICFIA)*, Berlín, 2.9.-7.9.2007, P81
11. O. Pavlíček, K. Mervartová, M. Polášek, J. Cabal, **Assay of cholinesterase activity by micro-SIA with lab-on-valve platform using stopped-flow technique**, *14. International Conference on Flow Injection Analysis (ICFIA)*, Berlín, 2.9.-7.9.2007, P59
12. K. Mervartová, M. Polášek, D. Lopéz, J. Martínez Calatayud, **Chemiluminiscenční stanovení verapamilu v tabletách technikou sekvenční injekční analýzy**, *36. Syntéza a analýza léčiva*, Bratislava, 11.-13.9.2007
13. H. Sklenářová, Z. Homolová, K. Mervartová, M. Polášek, **Determination of verapamil using permanganate-induced chemiluminescence in the sequential injection (SIA) system**, *13. International Symposium on Luminescence Spectrometry (ISLS)*, Boloňa, 7.-11.9.2008, PO139.

4.2 FIA/SIA a chemiluminiscence ve farmacii

Problematika stanovení léčiv ve farmaceutických přípravcích či v tělních tekutinách nebo tkáních technikou FIA a SIA s chemiluminiscenční detekcí byla v minulosti zpracována v několika přehledných publikacích [33, 68, 69]. Jedna z posledních prací byla vydána v roce 2001 [69] a zahrnuje články publikované v období 1997-2000. Příložená rešeršní práce jakožto součást této disertační práce navazuje na publikaci [69] a shrnuje příslušnou tematiku za období 2001-2006. V této publikované rešeršní práci (Příloha 1) jsou metody rozděleny dle jednotlivých chemiluminiscenčních systémů (nepřímé metody stanovení – luminol, siřičitan; přímé metody stanovení – manganistan, komplexy ruthenia, ostatní oxidační činidla a různé chemiluminiscenční reakce). V grafu 5 je uveden přehled publikací na téma chemiluminiscence a průtokové metody v analýze léčiv uveřejněných v letech 2001 až 2008. Na rešeršní práci (Příloha 1) navazuje v Tabulce 3 přehled FIA/SIA – CL metod s farmaceutickou problematikou, publikovaných v letech 2007-2008.

Graf 5. Rozdělení použitých CL reakcí podle typů za období 2001 – 2008 (celkový počet publikací 230)



Jak vyplývá z přehledu, okruh prakticky využitelných CL reakcí v kombinaci s průtokovými technikami je dosud poměrně úzký. Významným problémem se jeví poměrně nízká selektivita u přímých CL reakcí, což však nemusí být na závadu při stanovení účinné látky v jednodušších farmaceutických přípravcích. Zřejmě proto se většina publikovaných prací zabývá vypracováním metod CL stanovení účinné látky ve farmaceutickém přípravku (nejvíce tablety), ale je publikována i řada prací hledajících využití v klinické praxi (složitější matrice). V některých publikacích bylo dosaženo zlepšení selektivity díky použití elektrogenerované chemiluminiscence nebo použitím preseparačních postupů před vlastní CL analýzou vzorku. Výhodou průtokových metod je možnost automatizace takovýchto kroků před vlastní analýzou.

Selektivita CL analýzy může být zvýšena např. extrakcí na pevnou fázi (solid-phase extraction, SPE) pomocí tzv. „molecular imprinted polymers“ (MIPs) (vtištěná informace molekuly do polymeru). MIPs se připravují kopolymerací funkčních monomerů a síťujících složek za přítomnosti analyzované molekuly, čímž vzniká prostorová síť s póry velikosti analyzované látky, která je po vytvoření polymeru vymyta. MIP je vpraven do skleněné kapiláry a začleněn do průtokového systému (jako průtoková cela). Při analýze je žádaná látka zachycena v pórech MIPu (dochází k jejímu zakoncentrování), přičemž ostatní látky matrice nejsou zachyceny. Po vymytí případných nežádoucích potenciálně interferujících látek je MIP se zachycenou analyzovanou látkou vystaven působení CL činidel [70].

Automatizace je ve většině prací dosažena technikou FIA. Jen menší počet prací aplikuje SIA k automatizaci CL analýzy s využitím přímých CL reakcí manganistanu [71-74] a komplexu ruthenia [75, 76]. Kromě konvenčního způsobu vpravení CL činidel do systému (kontinuální čerpání ve FIA, aspirace v SIA) byla popsána speciální technika ukotvení činidel na vhodný nosič (např. polymerní ionex) [77, 65]. Ionex je podobně jako MIPs vpraven do miniaturní kolony (skleněné kapiláry) a začleněn do průtokového systému jako tzv. „flow sensor“ nebo „solid phase reactor“. CL činidlo je pak postupně vymýváno nosným proudem během analýzy. Výhodami takovéto úpravy jsou jednoduchost a nízká spotřeba činidel. Na druhou stranu musíme počítat s určitou konečnou

životností senzoru, protože se imobilizovaná čidla za nějaký čas totálně vymyjí (senzor se musí pravidelně obnovovat).

Tabulka 3. – Přehled CL stanovení léčiv metodami FIA a SIA v období 2007-2008

CL reakce	Reakce / průtokový systém	Kalibrační rozsah (ng/ml)	LOD (ng/ml)	RSD [%] (n)	Frekvence dávkování [vzorek/h]	Matrice	Ref.
Reakce luminolu							
Dexametazon acetát	Reakce hexakvanoželezitanu / FIA, extrakce	0,044 – 4,4 µg/ml	0,01 µg/ml	1,8 (11)	20	Mast	[78]
Diacerein	Reakce luminolu a peroxidu vodíku / FIA	1,0 - 500	0,2	1,1 (8)	120	Farmaceutické přípravky	[79]
Fenotiaziny:							
Chlorpromazin		2 - 1000	0,4	0,4 - 1,2			
Perfenazin		4 - 3000	0,7	0,3 - 1,5			
Flufenazin	Reakce luminolu a	2 - 5000	2	0,5 - 1,6			
Thioridazin	manganistanu / FIA	5 - 1000	0,7	0,6 - 2,0 (11)	120	Injekce, moč	[80]
Fluorochinolony:							
Norfloxacin,		0,08 - 1,28 µg/ml	3,2	4,3			
Ciprofloxacín		0,013 - 1,32 µg/ml	9,5	1,5			
Lomefloxacín		0,014 - 1,4 µg/ml	7,0	1,7			
Fleroxacin	Reakce luminolu a peroxidu vodíku za přítomnosti částic zlata / FIA	0,029 - 1,46 µg/ml	9,0	1,3			
Levofloxacin		0,02 - 1,0 µg/ml	8,0	1,6	60	Lidská moč	[81]
		0,01 - 1,44 µg/ml	8,0	2,1			
Gatifloxacin	Reakce luminolu a myoglobinu / FIA	0,05 - 10	0,02	<4,0 (7)	-	Tablety, moč, sérum	[82]
Isoniazid	MIP, Reakce luminolu a jodistanu / FIA	2 - 200	0,7	2,8 (9)	-	Lidská moč	[83]
	2I ⁻ → I ₂ , který přechází přes hydrofóbní membránu. Jód je detekován luminolem / FIA, iontoměníč k odstranění kyseliny askorbové (↑ selektivita)	1,0 - 10,0 µg/ml	0,5 µg/ml	5,2 (10)	30	Multivitaminové tablety	[84]

CL reakce	Reakce / přítokový systém	Kalibrační rozsah (ng/ml)	LOD (ng/ml)	RSD [%] (n)	Frekvence dávkování [vzorek/h]	Matrice	Ref.
Látka							
Katecholaminy:							
Noradrenalin		1,1 – 20	0,34	1,26	113		
Adrenalin		0,5 – 5	0,15	3,03	96		
Dopamin	Inhibice CL reakce luminolu a jódu / FIA	0,6 – 9	0,18	2,21	82	Farmaceutické přípravky	[65]
l-dopa		0,6 – 10	0,18	0,65 (15)	87		
Klindamycin	Inhibice CL reakce luminolu a myoglobinu / FIA	0,1 – 70,0	0,03	<3,0 (5)	120	Lidské sérum a moč	[86]
Klindamycin	Inhibice CL reakce luminolu a hexakvanoželezitanu / FIA	0,7 – 1000 (log c)	0,2	<5,0 (7)	120	Farmaceutické přípravky, lidská moč	[87]
Norfloxacín	Reakce luminolu a rozpuštěného kyslíku / FIA	0,4 - 400	0,1	<3,0	120	Farmaceutické přípravky, lidská moč, sérum	[88]
Přímé reakce komplexu ruthenia							
Fenoterol	ECL s komplexem ruthenia / FIA	10 – 100 µM	0,24 µM	<2,5		Tablety	[89]
Salbutamol		10 – 100 µM	0,40 µM	<1,3 (15)	50		
Fluorochinolony:							
Ofloxacín	Oxidace komplexem ruthenia (chemická příprava Ce(IV)), rozdílení dle kinetiky reakce / FIA	0,7 – 15 µg/ml	0,48 µg/ml			Farmaceutické přípravky (tablety)	[90]
Ciprofloxacín		1,3 – 30 µg/ml	0,96 µg/ml				
Norfloxacín		1,4 – 43 µg/ml	1,05 µg/ml	-			
Chinolony (Ciprofloxacín)	ECL s komplexem ruthenia / FIA	0,2 – 100 µM	0,2 µM	6,6 (10)	120	Tablety	[91]
Indometacin	Oxidace komplexem ruthenia (etanol, octan) (chemická příprava Ce(IV)) / SIA	0,1 – 50 µM	0,05 µM	2,0 – 2,4 (10)	180	Mast, gel	[75]
Noskapin (Narkotin)	Oxidace komplexem ruthenia (generován chemicky – Ce(IV)) / FIA	0,3 – 200 µM	66 nM	1,0 (10)	100	Sirupy	[92]
Přímé reakce manganistanu							
Doxorubicin	Oxidace manganistanem	0,1 – 100 µg/ml	30	2,2		Injekce	[93]
Mitomycin	draselným v přítomnosti	0,01 – 60 µg/ml	3	1,8 (11)	-		

Disertační práce

CL reakce	Reakce / průtokový systém	Kalibrační rozsah (ng/ml)	LOD (ng/ml)	RSD [%] (n)	Frekvence dávkování [vzorek/h]	Matrice	Ref.
Látka	formaldehydu / FIA						
Fluorouracil	Oxidace manganistanem v přítomnosti formaldehydu / FIA	-	30	1,8		Farmaceutické přípravky, biologické tekutiny	[94]
Sulfadiazin	Oxidace manganistanem draselným v přítomnosti formaldehydu v kyselině polyfosfátové / FIA	0,8 – 200 µM	0,2 µM	2,53 (11)	-	Nosní kapky	[95]
Reakce siřičitanu							
Ibuprofen	Reakce manganistanu siřičitanu / FIA	a 0,1 – 10,0 µg/ml	20	1,8 (11)	120	Farmaceutický přípravek a moč	[96]
Ketoprofen	Reakce manganistanu siřičitanu / FIA	a 0,05 – 3,0 µM	20 nM	0,8 (15)	180	Kapsle, lidská moč	[97]
Tyroxin	Reakce manganistanu siřičitanu / FIA	a 0,1 – 2 µM	5,0 nM	1,0 – 1,9 (4)	180	Tablety	[98]
Riboflavin	Reakce siřičitanu a chlordioxidu / FIA	-	-	-	-	Farmaceutický přípravek	[99]
Peroxyoxalátová reakce							
Sulphadiazine	Peroxyoxalátová reakce (TCFO), tetrahydrofuran, SDS / FIA	380 - 2000	126	4,8 (12)	-	Tablety, (veterina)	[100]
Ostatní nepřímé CL systémy							
Penicilamin	Derivatizace analytu aldehydy, reakce komplexu ruthenia a peroxodisiranu / SIA	0,2 – 24 µg/ml 0,2 – 20 µg/ml	0,1 µg/ml 0,03 µg/ml	0,45 – 1,3 0,95 – 4,3	30	Tablety, kapsle, nosní roztok	[101]
Tyroxin (stanovení NADH)	Reakce komplexu ruthenia a NADH / FIA	20 – 100 nM (NADH 13 – 1300 nM)	1,0 nM (NADH 1 – 0,1 nM)	2 – 4,5 3,5 (4)	-	Tablety	[102]
Tyroxin (stanovení	ECL, Reakce komplex ruthenia a NADH / FIA	50 – 6000 nM (NADH 50 – 1800 nM)	50 nM (NADH 50 nM)	0,11 – 1,5 (NADH 0,25 60	60	Tablety	[103]

CL reakce	Reakce / průtokový systém	Kalibrační rozsah (ng/ml)	LOD (ng/ml)	RSD [%] (n)	Frekvence dávkování [vzorek/h]	Matrice	Ref.
NADH			nM	- 2,1) (4)			
Nitrofurazon	Reakce H ₂ O ₂ a N-bromosukcinimidu v zásaditém prostředí / FIA	0,1 - 10 µg/ml	20	< 4 (11)	-	Nosní kapky, lidská plazma, moč [104]	
Fenfluramin	Reakce manganistanu a calceinu / FIA	0,1 - 6,0 µg/ml	60	2,2 (11)	-	Kapsle, čaje (přípravky na redukci váhy) [105]	
Peurarin	Reakce manganistanu a glyoxalu / FIA	10 - 7000	3	<3,0	120	Injekce, lidská moč Farmaceutické přípravky, lidská moč [106]	
Bromhexin	Reakce Ce(IV) a morinu / FIA	2,0 - 200	0,9	1,0 (11)	-	Farmaceutické přípravky, lidská moč [107]	
Loperamid	Post-CL, do reakce N-chlorosukcinimidu a dichlorofluorescenu je nastříknut loperamid	0,8 - 600	0,4	2,4 (11)	-	Lidská plazma, farmaceutické přípravky [108]	
Ostatní přímé CL systémy							
Rifampicin	ECL v přítomnosti K ₂ S ₂ O ₈ / FIA	0,1 - 400 µM	39 nM	-	-	Farmaceutický přípravek, lidská moč [109]	
Kyselina listová	Reakce peroxosiranu - Co(II) / FIA	1 - 800 nM	0,6 nM	2,63 (11)	-	Tablety, lidská moč [110]	
Prokaterol	Oxidace Ce(IV), v přítomnosti Rhodaminu B v H ₂ SO ₄ + HCl, surfaktant CTMAB / FIA	20 - 1000	6	1,6 (11)	-	- [111]	
Katecholaminy: Adenalin Dopamin L-Dopa	Oxidace chlornanem v zásaditém prostředí za přítomnosti dichlorofluoresceinu / FIA	3 - 80 µg/ml 3 - 50 µg/ml 3 - 80 µg/ml	-	-	-	Farmaceutické přípravky [112]	

4.3 Chemiluminiscenční stanovení pesticidu chlorsulfuronu pomocí průtokové multikomutační metody

Chlorsulfuron patří do skupiny herbicidů odvozených od sulfonylmočoviny. Molekula obsahuje 2 aromatická jádra (substituovaný benzen a triazin) a je méně rozpustná ve vodě. Nežádoucí zbytky chlorsulfuronu se mohou nacházet v půdách a to ve velmi nízkých koncentracích.

Jeho stanovení ve vodných extraktech tudíž vyžaduje použití dostatečně citlivých metod. Stanovení by mělo být rychlé a proveditelné nejlépe v místě odběru vzorku.

Tyto požadavky splňuje spojení průtokových metod a chemiluminiscenční detekce. Z průtokových metod byla aplikována metoda využívající solenoidních ventilů – multikomutační metoda. Teoretické podklady, výhody a nevýhody jsou popsány v kap. 3.1.4.

Práce byla publikována a je připojena jako Příloha 2.

4.3.1 Optimalizace metody

Chlorsulfuron byl oxidován běžnými CL činidly, v žádné z testovaných přímých reakcí však nebyl pozorován využitelný chemiluminiscenční signál. V publikaci [65] bylo prokázáno, že lze některé pesticidy degradovat pomocí UV záření na fragmenty, které následně v reakci vykazovaly chemiluminiscenci

V naší práci (Příloha 2) byl do průtokového systému integrován zdroj UV záření, kolem nějž byla obtočena hadička analyzátoru. Přes tento fotoreaktor protékal vzorek před reakcí s příslušným CL činidlem. Po otestování běžných CL oxidačních činidel (manganistan, Ce (IV), hexakynoželezitan a bromsukcinimid) byla pozorována chemiluminiscence v reakci s manganistanem draselným v kyselině sírové.

UV-degradace a následná chemiluminiscence závisí na mediu, v němž je vzorek připraven. Byl testován vliv pH (octanový pufr pH 4,8; fosfátový pufr pH 7,0; glycinový pufr pH 3,8 a 8,6; amoniakální pufr pH 9,4, tetraboritanový pufr pH 10,5, kyselina sírová; hydroxid sodný) a přítomnost chemických katalyzátorů (Fe^{2+} , Fe^{3+} , H_2O_2). U všech medií byla zaznamenána chemiluminiscence po UV-degradaci a jen velmi slabá bez degradace. Výrazně vyšší intenzita CL oproti ostatním

tlumivým roztokům byla naměřena při použití glycinového pufru o pH 9,6. Vzhledem k tomu, že u borátového pufru o pH 9,6 byla pozorována podstatně nižší intenzita CL, lze předpokládat, že se glycin účastní CL reakce.

V literatuře nacházíme práce, které využívají vliv polyfosfátu (hexametafosfátu) v reakci s manganistanem draselným [72, 113]. Jako kyselé prostředí pro oxidační činidlo manganistan byla testována jak kyselina sírová tak i kyselina polyfosforečná. Směrnice kalibrační přímky při použití kyseliny polyfosforečné byla výrazně vyšší (strmá lineární závislost) a kalibrace byla lineární v celém testovaném rozsahu chlorsulfuronu ($1-20 \text{ mg l}^{-1}$) na rozdíl od kalibrace získané s kyselinou sírovou, která se blížila limitě (lineární závislost byla pouze při nízkých koncentracích). Celý systém byl optimalizován s oběma kyselinami.

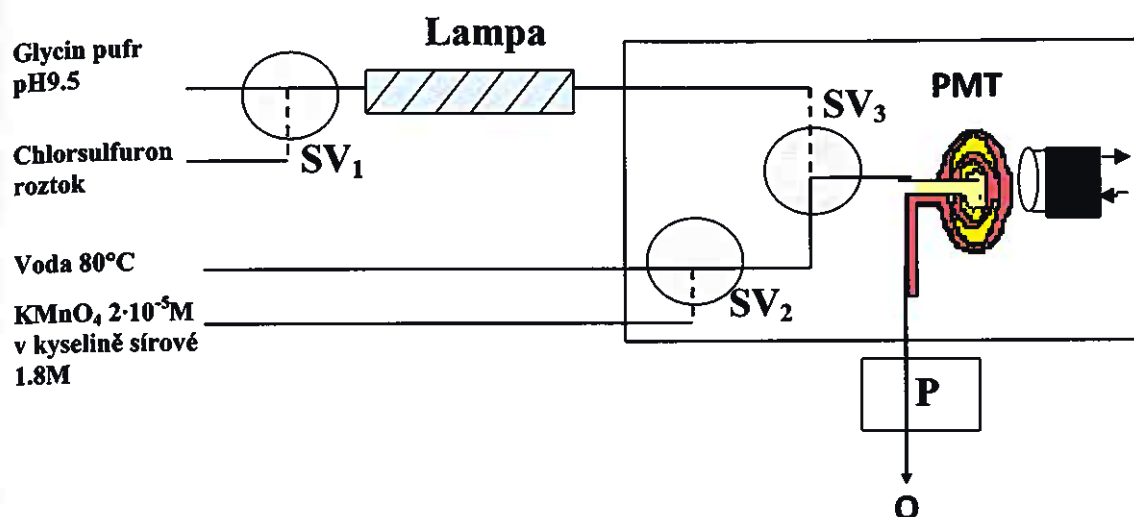
Chemiluminiscence může být zesílena například povrchově aktivními látkami, ovlivňujícími stabilitu radikálů, které se účastní vlastní CL reakce. Kromě tenzidů byly testovány i látky ovlivňující fotodegradaci. Žádná z testovaných látek nepřinesla příznivý efekt na výtěžek CL reakce.

Vyšší teplota zvyšuje kinetickou energii a četnost náhodných srážek mezi molekulami, což může způsobit jejich rychlejší deaktivaci. Proto byla teplota a průtok sledovány společně. Optimální teplota pro systémy s kyselinou sírovou a polyfosforečnou byla 80°C . Po fotodegradaci však bylo nutné ochladit reakční směs průtokem přes ledovou lázeň, aby nedošlo k poškození čerpacích hadiček peristaltického čerpadla.

4.3.2 Validace metody

Na obrázku 10 je znázorněna multikomutační aparatura a vstupní činidla za optimálních podmínek.

Obrázek 10. Optimální podmínky a multikomutační analyzátor pro stanovení chlorsulfuronu



SV1-3 – solenoidní ventily; PMT – fotonásobič (*photomultiplier tube*); P – peristaltická pumpa; O - odpad

Tabulka 4 Přehled validačních parametrů

Validační parametr	Výsledek	Komentář
Studovaný rozsah	0,06 – 20 mg l ⁻¹	
Správnost	95 – 109 %	Reálné vzorky balených minerálních vod. Metoda standardního přidavku, <i>Recovery</i>
Přesnost – opakovatelnost	3,4 – 3,8 %	RSD; <i>n</i> =19; koncentrace 0,4 a 1,3 mg l ⁻¹
Linearita - Korelační koeficient	0,1 – 1,3 mg l ⁻¹ 0,992 ± 0,005	Korelační koeficient (<i>R</i> ²) získán ze 6 kalibračních závislostí.
Limit detekce	0,06 mg l ⁻¹	Pro poměr <i>S/N</i> = 3
Selektivita	Ruší Cu ²⁺ a NO ₃ ⁻	Lze vyřešit zapojením kolony s vhodným iontoměničem.

Vyvinutá metoda není zcela selektivní. Pro odstranění interferujících iontů byly využity kolony Amberlite 200 (kationová, Sigma Aldrich), Duolite C20 (kationová, Probus) a Duolite A-102D (aniontová, Probus) v off-line režimu.

Kromě vzorků balených minerálních vod, kdy metodou standardního přidavku byla potvrzena správnost metody (95 – 109 %), byly testovány i vzorky

pitné vody, vody ze studny a podzemní vody. V těchto případech byla zaznamenána systematická chyba plynoucí z interferujících iontů. Pro stanovení takovýchto vzorků je nutné využít separaci například pomocí testovaných pryskyřic.

Vyvinutá metoda je citlivá a rychlá (26 stanovení za hodinu), nezatěžuje příliš životní prostředí díky nízké spotřebě činidel a umožňuje provést analýzu v místě odběru vzorku, protože průtokové zařízení je přenosné.

4.4 Automatizovaný sekvenční injekční analyzátor pro sledování uvolňování léčiva z polotuhých topických přípravků

Cílem tohoto projektu (viz publikace Příloha 3) bylo sestrojít automatizovaný SIA systém pro sledování uvolňování léčiva z mastí, či gelů. Jako modelová látka byla zvolena kyselina salicylová v masti a její fluorescenční detekce. V práci [7] byla uveřejněna automatizace sledování uvolňování kyseliny salicylové z masti, kde byla využita jedna Franzova cela zapojená do SIA analyzátoru.

Uvolňování léčiva z polotuhého přípravku dává komplexní informaci o vlastnostech konečného produktu. Tímto testem jsou kontrolovány případné změny ve výrobním procesu, vliv složení pomocných látek nebo vlastní kvalita přípravku. Principem testování je zjistit rychlost uvolňování léčivé látky přes membránu, imitující kůži.

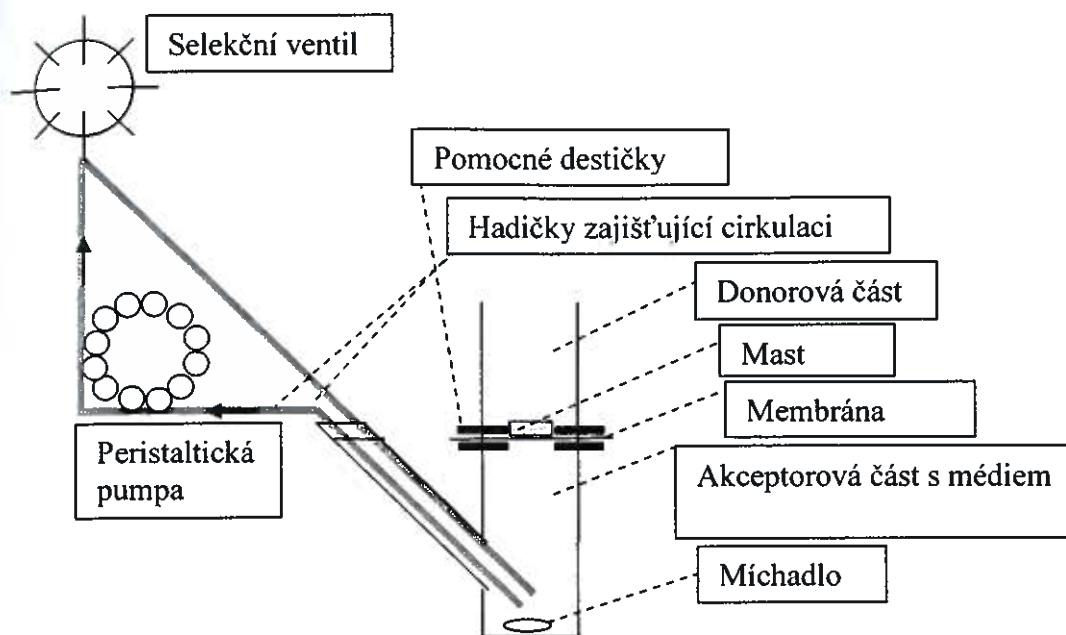
Franzova difúzní cela (doporučení FDA) je speciálně sestrojená otevřená difúzní komora skládající se ze dvou částí - donorové a akceptorové, které jsou odděleny membránou. V donorové části je mast nanesena na membránu, která z opačné strany přiléhá k akceptorové části vyplněné médiem, do kterého se léčivo uvolňuje. V pravidelných intervalech se sleduje vzrůstající koncentrace léčiva v akceptorovém médiu. Membrána může být umělá simulující kůži nebo kůže (testování biodostupnosti).

Dle FDA [114] je doporučeno sledovat uvolňování léčiva po dobu nejméně 6 hodin ze 6 vzorků (cel), ze kterých je získán profil uvolňování (*release rate*). FDA požaduje minimálně 5 vzorků (*sampling*). Testování bez automatizace je časově náročné a pracné.

4.4.1 Výsledky a diskuze

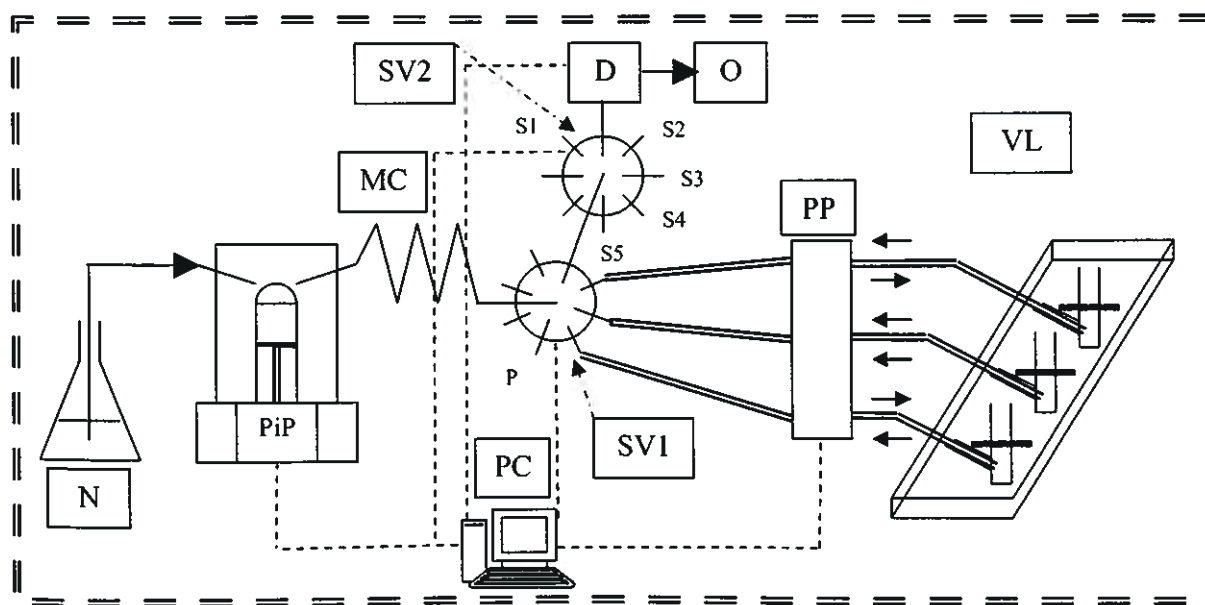
Speciálně vyrobená Franzova cela pro tento projekt je zobrazena na obrázku 11. Do vodní lázně temperované na 32 °C byly ponořeny 3 cely. Při rutinním využití je možné zapojení 6 až 9 Franzových cel. Akceptorová část byla vyplněna fosfátovým pufrem pH 7,4 (je žádoucí, aby médium napodobovalo fyziologické prostředí, ale neméně důležitým faktorem je rozpustnost sledovaného léčiva v médiu).

Obrázek 11. Zapojení Franzovy cely do SIA analyzátoru



V každé cele bylo míchadlo zajišťující neustálé promíchávání akceptorového média. Do cely byly zavedeny hadičky SIA analyzátoru. Medium po celou dobu testování cirkulovalo přes tuto smyčku poháněnou peristaltickou pumpou tak, aby odebraná část média odrážela koncentraci kyseliny salicylové v akceptorové části a aby byl minimalizován mrtvý objem.

Obrázek 12. Celý automatizovaný SIA systém se 3 Franzovými celami



N: nosný proud; PiP: pístová pumpa; MC: mísící cívka; SV: selekční ventil; D: detektor; O: odpad; PP: peristaltická pumpa; VL: vodní lázeň; PC: počítač; S1-S5 kalibrační standardy; P: pufr

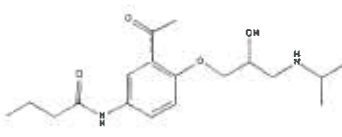
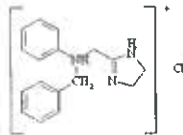
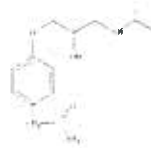
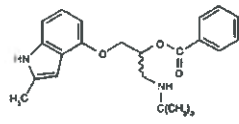
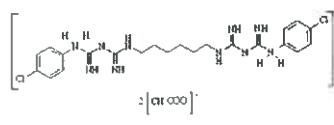
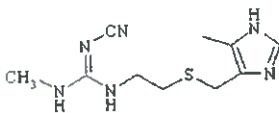
Kyselina salicylová byla detekována fluorimetricky. Její stanovení bylo plně automatizováno včetně průběžně prováděné kalibrace na 5 standardech, jelikož součástí vytvořeného analyzátoru byl další selekční ventil umožňující aspirovat příslušné kalibrační standardy v naprogramovaných intervalech.

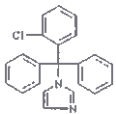
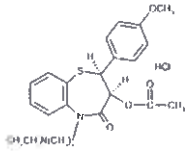
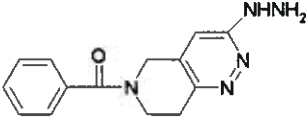
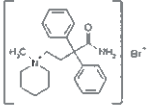
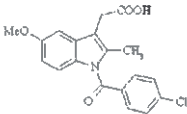
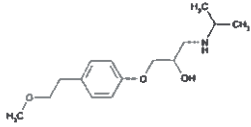
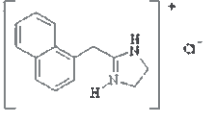
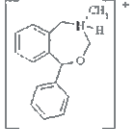
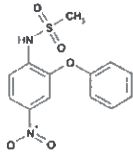
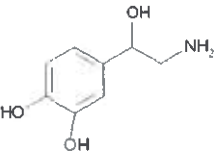
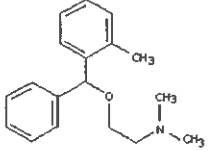
V rámci technologického testování byly automaticky sbírány hodnoty koncentrace uvolněné kyseliny salicylové v patnáctiminutových intervalech po dobu 6 hodin ze třech paralelních vzorků. Z těchto měření byl sestaven liberační profil.

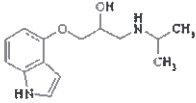
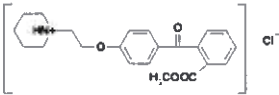
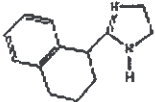
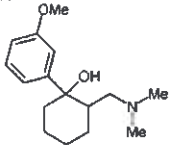
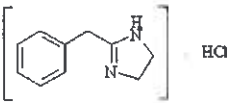
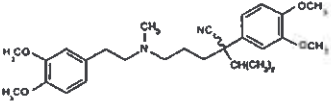
4.5 Chemiluminiscenční stanovení léčiv metodou sekvenční injekční analýzy

Metodou SIA s CL detekcí byla testována skupina farmaceuticky významných látek obsahujících ve své molekule dusík s cílem vytipovat léčiva, vhodná pro chemiluminiscenční stanovení s využitím přímé oxidace manganistanem v prostředí kyseliny sírové nebo reakcí s $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{3+}$ generovaným online z $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$ oxidací ionty $\text{Ce}(\text{IV})$ přímo v SIA systému. Přehled výsledků testů je uveden v Tabulce 5.

Tabulka 5. Screening nových přímých CL reakcí

Název	Vzorec	Reakce s KMnO_4	Reakce s $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{3+}$
Acebutolol		žádná odezva	-
Antazolin		-	slabá odezva
Atenolol		žádná odezva	slabá odezva
Bopindolol		vysoká odezva v metanolu i etanolu	slabá odezva
Chlorhexidin		-	slabá odezva
Cimetidin		odezva v etanolu	velmi slabá odezva

Clotrimazol		žádná odezva	velmi slabá odezva
Diltiazem		žádná odezva	vysoká odezva
Endralazin		vysoká odezva ve vodě a etanolu	slabá odezva
Fenpiverin		žádná odezva	slabá odezva
Indometacin		vysoká odezva v etanolu	vysoká odezva
Metoprolol		žádná odezva	vyšší odezva
Nafazolin		-	velmi slabá odezva
Nefopam		žádná odezva	vyšší odezva
Nimesulid		žádná odezva	žádná odezva
Norepinefrin		vysoká odezva ve vodě, metanolu a etanolu	vyšší odezva
Orfenadrin		žádná odezva	střední odezva

Pindolol		-	slabá odezva
Pitofenon		žádná odezva	střední odezva
Tetrahydrozolin		-	žádná odezva
Tramadol		žádná odezva	střední odezva
Tolazolin		žádná odezva	žádná odezva
Verapamil		slabá odezva	vysoká odezva

Na základě těchto výsledků byly vypracovány metody SIA-CL stanovení indometacinu (viz publikace Příloha 4) a verapamilu na základě CL reakce s $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{3+}$ (Příloha 5). Sekvenční analyzátor byl v obou projektech totožný a je znázorněn na Obrázku 3.

4.5.1 Stanovení indometacinu v masti a gelu

Publikovaná SIA-CL metoda stanovení indometacinu je uvedena v plném znění v Příloze 4.

Indolový derivát indometacin patří do skupiny látek s protizánětlivým, analgetickým a antipyretickým účinkem. Tato látka v těle brání syntéze prostaglandinů účastnících se zánětlivé reakce ale i prostaglandinů důležitých k tvorbě ochranného povlaku v trávicím traktu, což způsobuje dráždění žaludeční a střevní sliznice po perorálním podání. Indometacin je dostatečně lipofilní pro vstřebání kůží a může tak zasahovat do postižených tkání lokálně. Používá se pro léčbu zánětlivých onemocnění pohybového aparátu ve formě mastí či gelů.

V rámci optimalizace byly testovány různé koncentrace reakčních činidel a jejich pořadí při aspiraci do sekvenčního injekčního analyzátoru. Indometacin není dobře rozpustný ve vodě, proto byla studována i některá běžná rozpouštědla, která byla již v literatuře popisována u chemiluminiscenčních reakcí [115], a to metanol, etanol, aceton a acetonitril. Nejsilnější CL odezva byla zaznamenána u roztoků indometacinu v 50% etanolu.

Parametry sekvenční injekční analýzy (objemy aspirovaných zón, rychlost aspirace a rychlost průtoku detektorem) byly optimalizovány současně pomocí matematického modelu SIMPLEX.

Validace metody je shrnuta v Tabulce 6. Navrženou metodou je možno dávkovat vzorky frekvencí 180 vzorků za hodinu.

Tabulka 6. Přehled validačních parametrů SIA-CL stanovení indometacinu

Validační parametr	Výsledek	Komentář
Studovaný rozsah koncentrací indometacinu	0,1 – 50 μM	Kalibrační závislost v tomto rozsahu lze vyjádřit kvadratickou rovnicí; korelační koeficient $R = 0,9997$
Správnost	vyhovuje	Porovnání s referenční metodou – UV spektrofotometrie / <i>t</i> -test
Přesnost – opakovatelnost	2,02 – 2,40 %	RSD; $n=10$; koncentrace 0,5 a 7,0 μM
Linearita - Korelační koeficient, <i>R</i>	0,1 – 10 μM 0,9991	Kalibrační křivka získána ze stanovení 5 standardních roztoků, korelační koeficient se pohyboval od 0,9984 do 0,9998 (8 lineárních závislostí)
Limit detekce	50 nM	Pro $S/N = 3$

Metoda byla aplikována na dva typy přípravků, mast a gel. Obsah indometacinu byl stanoven referenční metodou [116] a výsledky porovnány s výsledky získanými CL-SIA metodou Studentovým *t*-testem. Nebyla nalezena významná odlišnost výsledků na hladině významnosti 95%. Pomocné látky přítomné v masťovém a gelovém základu testovaných přípravků stanovení nerušily. SIA-CL metoda je dostatečně robustní, citlivá a rychlá a proto vhodná pro rutinní stanovení indometacinu v masti a gelu.

4.5.2 Stanovení verapamilu v tabletách

Verapamil je blokátor kalciového kanálu v buňkách srdečního svalu, jenž způsobuje vazodilataci a snížení rychlosti vedení vzruchu a zpomalení sinusového rytmu. Využívá se především jako antiarytmikum a hypotenzivum. Na trh je převážně distribuován ve formě tablet (léky vázané na recept).

V rámci optimalizace byl kromě koncentrací reakčních činidel testován vliv pH a složení tlumivých roztoků na chemiluminiscenční reakci verapamilu s $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{3+}$. Bylo zjištěno, že reakce v nepufrovaném prostředí vykazuje jen velmi slabou CL. Podstatného zvýšení CL bylo dosaženo v prostředí octanového, jantaranového nebo ftalátového pufru. Přídavek fosforečnanu do reakčního média zhášel chemiluminiscenci. Jako optimální byl vybrán octanový pufr o pH 5,4.

Podobně jako při stanovení indometacinu byl testován vliv rozpouštědla (aceton, acetonitril, metanol a etanol) na intenzitu CL. Nejvyšší signál byl pozorován u roztoků verapamilu v 50% metanolu.

Validační parametry navržené SIA-CL metody stanovení verapamilu jsou uvedeny v Tabulce 7. Rychlost analýzy je srovnatelná s metodou stanovení indometacinu.

Tabulka 7. Přehled validačních parametrů SIA-CL stanovení verapamilu

Validační parametr	Výsledek	Komentář
Studovaný rozsah	0,01 – 20 μM	
Správnost	vyhovuje	Statistické porovnání s lékopisnou metodou [117] <i>t</i> -testem.
Přesnost – opakovatelnost	1,54 – 1,93 %	RSD; <i>n</i> =10
Linearita - Korelační koeficient, <i>R</i>	0,01 – 20 μM 0,9997	Kalibrační křivka získána na základě měření 12 standardních roztoků,
Limit detekce	10 nM	Pro S/N = 3

Navrženou metodou byly analyzovány tablety Isoptin 40 mg. Obsah verapamilu byl paralelně stanoven také referenční lékopisnou metodou [117] a výsledky byly porovnány s výsledky získanými SIA-CL metodou Studentovým *t*-testem. Nebyla nalezena významná odlišnost výsledků na hladině významnosti

95%. Výsledky získané navrženou metodou jsou správné. Pomocné látky v tabletách stanovení neruší.

Byla vyvinuta robustní, citlivá a rychlá metoda pro rutinní stanovení verapamilu v tabletách (viz Příloha 5).

4.6 Vliv organických rozpouštědel na CL reakce manganistanu a komplexu ruthenia(III) s vybranými léčivy

V publikacích [118-121], které se zabývají stanovením léčiv na základě CL reakce s manganistanem nebo komplexem ruthenia(III) je dávkovaný vzorek připraven v jiném rozpouštědle než ve vodě nebo je testován přidavek rozpouštědla do chemiluminiscenční reakce. V některých případech je pozorován jejich pozitivní vliv na výtěžek CL [115].

Rozpouštědlo elektrostatickými silami působí na molekuly rozpuštěných látek, což může ovlivnit stabilitu základního a excitovaného stavu částic účastnících se CL reakce [4].

Při chemiluminiscenčních reakcích manganistanu a komplexu ruthenia byla v některých případech použita rozpouštědla jako metanol [115, 118], etanol [119, 120], 2-propanol [121], aceton, acetonitril a dimethylformamid. Další rozpouštědla v této souvislosti v literatuře diskutována nejsou. V rámci tohoto projektu proto byl studován vliv vybraných rozpouštědel ze skupiny alkoholů a některých dalších běžných rozpouštědel na uvedené CL reakce. Seznam 22 testovaných rozpouštědel je uveden v tabulce 8.

Tabulka 8. Testovaná rozpouštědla

Primární alkoholy	Sekundární alkoholy	Terciární alkoholy	Dioly	Polyoly	Nealkoholická rozpouštědla
Metanol Etanol 1-propanol 1-butanol 2-metyl-1-propanol	2-propanol 2-butanol	2-metyl-2-propanol	1,2-ethandiol 1,2-propandiol 1,3-propandiol 1,2-butandiol 1,3-butandiol 2,3-butandiol 1,4-butandiol	Glycerol Polyvinylalkohol	Aceton Acetonitril Dimethylformamid Dimetylsulfoxid

Léčiva verapamil a endralazin byla vybrána jako modelové látky na základě předchozího testování (kapitola 2.3) a byla rozpuštěna ve směsích voda – organické rozpouštědlo o různém obsahu organické složky. U verapamilu byl stanovován vliv na CL s komplexem (2,2'-bipyridyl)ruthenium(III) (při optimalizovaných podmínkách kapitola 4.3) i manganistanem draselným. U endralazinu byl studován vliv pouze na CL reakci s manganistanem. Stanovení byla provedena na sekvenčním injekčním analyzátoru, viz obrázek 3. Intenzita

chemiluminiscence při nástřiku vzorku ve smíšeném prostředí byla porovnávána s intenzitou signálu u vzorku léčiva o stejné koncentraci ve vodném roztoku.

4.6.1 Výsledky a diskuze

CL intenzita slepého vzorku se mění s použitým rozpouštědlem a jeho koncentrací, proto byl sledován vedle rozdílu signálu vzorku (S) a slepého vzorku (B) $\Delta I(\text{CL})$ i jejich poměr S/B. Oba tyto parametry byly vztaženy na stanovení analytu ve vodě (relativní $\Delta I(\text{CL})^*$ a $(\text{S/B})^*$). Výsledky jsou uvedeny v příloze 6.

Reakce endralazinu a manganistanu byla nejvíce ovlivněna rozpouštědly 2-propanolem 80%, kde bylo pozorováno 120 násobné zvýšení intenzity $\Delta I(\text{CL})$ oproti vodě, a 1,2-propandiolem 2%, u kterého byl celkový signál endralazinu ku slepému vzorku 3x vyšší než při stanovení ve vodě. V obou těchto rozpouštědlech byly připraveny nízké standardní koncentrace endralazinu. Kalibrační křivka sestavená ze standardů v 80% 2-propanolu byla v testovaném rozsahu téměř lineární, kdežto křivky standardní řady připravené ve vodě a 2% 1,2-propanediolu měly tvar polynomu (x^2). Detekční limit byl 5 krát nižší s 1,2-propandiolem 2% než u vody a 2-propanolu 80%. Opakovatelnost stanovení byla u vzorku v obou rozpouštědlech lepší než ve vodě.

Reakce verapamilu a manganistanu je málo citlivá, rozdíl v použitém rozpouštědle je méně významný. V druhé reakci s komplexem ruthenia byla intenzita $\Delta I(\text{CL})$ zvýšena více než 4krát oproti vodě u dimetylformaimdu 40% a 1,2-butandiolu 50%. Poměr celkového signálu verapamilu v 40 % 1,2-propanediolu a slepého vzorku vzrostl 2,2krát oproti stanovení ve vodě. Limit detekce verapamilu v těchto třech rozpouštědlech a ve vodě byl stejný. Podobně jako u reakce endralazinu a manganistanu se zlepšila opakovatelnost stanovení oproti analýze ve vodě.

Na CL reakci s manganistanem mají negativní vliv rozpouštědla bez alkoholové skupiny a polyvinylalkohol.

Vliv rozpouštědel na limit detekce nebyl jednoznačně prokázán. Pouze při dávkování roztoků verapamilu ve 2% 1,2-propandiolu se hodnota LOD snížila pětkrát ve srovnání s vodným roztokem verapamilu.

Kalibrační závislost léčiva měla strmější průběh než u analytu ve vodě.

5 Přílohy

- 5.1 *Příloha 1: K. Mervartová, M. Polášek, J. Martínez Calatayud, Recent applications of flow-injection and sequential-injection analysis techniques to chemiluminescence determination of pharmaceuticals, J. Pharm. Biomed. Anal. 45 (2007) 367-381*

Available online at www.sciencedirect.com
**JOURNAL OF
PHARMACEUTICAL
AND BIOMEDICAL
ANALYSIS**

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 45 (2007) 367–381

www.elsevier.com/locate/jpba

Review

Recent applications of flow-injection and sequential-injection analysis techniques to chemiluminescence determination of pharmaceuticals

 Kateřina Mervartová^{a,*}, Miroslav Polášek^a, José Martínez Calatayud^b
^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

^b Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

Received 15 May 2007; accepted 17 August 2007

Available online 21 August 2007

Abstract

A review is presented on the state of the art of the chemiluminescence analysis of pharmaceuticals by the two most relevant automated controlled-flow methodologies—flow-injection analysis (FIA) and sequential-injection analysis (SIA). The current chemiluminometric applications of FIA and SIA in pharmaceutical analysis are discussed with special emphasis on the analytical figures of merit and sample matrix characteristics. The review involving 211 references and covering papers published between 2001 and 2006 is divided into several sections according to the fundamental types of chemiluminescence systems employed.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Pharmaceuticals; Sequential-injection analysis (SIA); Flow-injection analysis (FIA); Chemiluminescence; Review

Contents

1. Introduction	367
2. Luminol system	368
3. Sulphite system	372
4. Direct CL methods	373
4.1.1. Oxidation with potassium permanganate	373
4.1.2. Oxidation by (2,2'-bipyridine)ruthenium(II) complex	373
4.1.3. Other oxidation CL reactions	377
5. Miscellaneous reactions	377
6. Conclusions	379
Acknowledgements	379
References	379

1. Introduction

Chemiluminescence (CL) is defined as a process producing electromagnetic (ultraviolet, visible or near-infrared) radiation as a result of a chemical reaction (usually an oxidation) in which one of the reaction products occurs in an excited state and emits

light when returning to its ground state. Normally the amount of energy released during a chemical reaction dissipates as heat. Therefore CL is not very common phenomenon.

As written in review [1] CL reached analytical attention in the middle of 20th century when Eley in 1957 studied the use of several substances such as luminol, lophine and lucigenine as volumetric indicators.

In contrast to spectrophotometry and fluorimetry, the absence of strong background light levels in CL methods reduces noise signals and leads to improved detection limits (better sensitivity)

* Corresponding author. Tel.: +420 495763391; fax: +420 495067164.
E-mail address: Kateřina.Mervartova@faf.cuni.cz (K. Mervartová).

and wide linear dynamic ranges. Moreover, the absence of the light excitation source leads to a low cost and simple operation of the instruments resulting in a simple, robust and cost-effective apparatus. Some shortcomings of the CL procedures are similar to other spectrometric systems as, e.g., limited selectivity due to the fact that usually a given CL reagent gives positive response to a group of similar compounds rather than just to a single analyte. Another drawback is the dependence of the CL emission on various environmental factors which must be controlled since the intensity of CL emission changes with time and this emission-versus-time profile can vary widely in different CL systems [2]. At present the CL detection is applied in many analytical fields such as environmental, biomedical, pharmaceutical, food and beverage, etc., as can be found in recent literature.

There are two basic ways to measure the CL emission, namely by the batch technique and in flow systems. In the batch methods the sample or reagent solution is injected by a syringe into a CL cell containing solution of appropriate reactants; this cell should be placed as close as possible to the photosensor/photomultiplier detector window [3]. In the batch CL mode it is difficult to achieve rapid and efficient mixing of reactants and the process is not easily automated [2]. On the other hand, in flow systems represented by flow-injection analysis (FIA) [4] and sequential-injection analysis (SIA) [5] the analyte and the reagents flow continuously or in a pre-programmed series of flow pulses through manifold channels to the detector flow cell where the CL emission is monitored. Several improvements compared to the batch procedure can be pointed out, namely: higher sample throughput, possibility of on-line preparation of unstable reagents, automation of the system and reduced sample and reagent consumption.

Characteristic feature of FIA and SIA techniques is the ability of automated efficient and reproducible mixing of small volumes of sample and reagents. If the mixing takes place as close as possible to the photodetector window even fast CL reactions can be recorded. Since the timing of the mixing process is fully reproducible it is unnecessary to measure the whole CL emission profile. Therefore with the development of FIA and SIA the use of fast and reproducible chemiluminescence detection became considerably attractive.

The theme of CL as analytical tool was processed in a monograph [2] and the advantageous marriage between the continuous flow techniques and the CL in pharmaceutical analysis has been reviewed in a number of articles [3,6,7]. As far as the authors know, the most recent review considering this topic appeared in 2001 [7] and it dealt with papers published during the period

1997–2000. The present paper deals with papers utilizing CL detection coupled with SIA and FIA for the determination of pharmaceuticals (drugs) that were published during the period 2001–2006 (May–June).

In the present review the methods are classified according to the kind of the CL process to direct and indirect CL assays. In the direct methods the CL is emitted due to direct interaction between the analyte and CL reagent (usually a redox reaction) whereas in the indirect methods the analyte merely influences an indicator CL reaction and plays the role of an inhibitor or sensitizer; typical indicator reactions utilized in this indirect assays are based on the oxidation of luminol, lucigenin, lophine, sulphite or peroxyoxalates.

2. Luminol system

Luminol (5-aminophthalhydrazide) is so far the most frequently used CL reagent. The CL emission of luminol is based on its oxidation by hydrogen peroxide, hexacyanoferrate(III), permanganate, *N*-bromosuccinimide (or *N*-chlorosuccinimide), periodate, dichromate, persulphate, dichlorocyanurate or trichlorocyanuric acid, chlorate and electrogenerated hypobromite in alkaline medium (see Table 1). According to the well-known mechanism the supposed emitter is excited 3-aminophthalate anion whose maximum emission occurs at 425 nm [2].

The relevance of the luminol as analytical CL reagent does not rely on the emission efficiency but on possibilities that many different species can influence the mechanism and the kinetics of the indicator reaction (Fig. 1). The analyte can act as enhancer, inhibitor or catalyst whose concentration may influence the intensity or amount of emitted light.

For example enzymes such as polyphenol oxidases (from plant juice) are able to catalyze the oxidation of mono-, di- and polyhydric phenols generating activated oxygen species (e.g. superoxide radical) reacting with luminol with CL emission. Such enzymes obtained from raw apple juice were utilized for the CL determination of adrenaline [8].

Some catalysts such as Cu(II), Co(II) and Fe(III)/Fe(II) were implemented into the luminol/oxidant system to improve sensitivity of the indirect assay. Thus Cu(II) was used as a catalyst in the determination of methimazole and carbimazole [9]; these drugs formed complex species with Cu(II) and thus inhibited Cu(II)-catalysed luminol–hydrogen peroxide reaction; with increasing concentration of analyte equilibrium concentration of Cu(II) diminished and this resulted in the decrease of CL

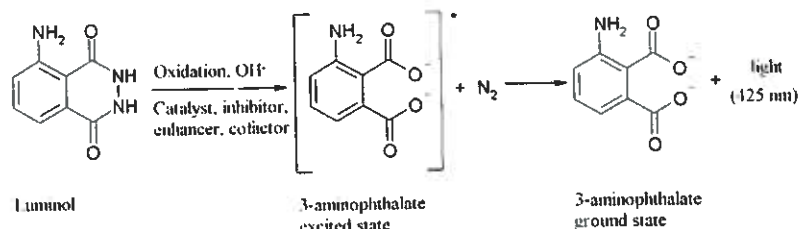


Fig. 1. Luminol CL scheme.

Table 1
CL systems based on the oxidation of luminol/FLA

Analyte	Action of the analyte/chemical system	Calibration range	LOD	Throughput (samples/h)	Sample	References
Oxidant system: hexacyanoferrate(III) in alkaline medium						
Adrenaline	MIP, presence: ferrocyanide	5–100 nM	3 nM	–	Serum	[12]
Berberine	Inhibitor/solid-phase reactor	0.05–300 ng/ml	0.02 ng/ml	–	Tablets	[21]
Captopril	Enhancer, presence: ferrocyanide	0.1–40 µg/ml	–	90	Pharmaceuticals	[22]
Cefmetazole	Presence: ferrocyanide	0.3–1.5 ng/ml	0.06 ng/ml	–	Residues in pharmaceuticals manufacture	[23]
Dipyridamole	Enhancer	0.1–50 ng/ml	–	–	Pharmaceuticals	[24]
Dobesilate	Inhibitor	0.2–16 µg/ml	44 ng/ml	300	Capsules	[25]
Dobesilate	Inhibitor/solid-phase reactor	0.2–100 ng/ml	–	40	Pharmaceuticals, human urine	[26]
Dobutamine	Enhancer, presence: ferrocyanide	0.1–100 ng/ml	0.026 ng/ml	90	Injection	[27]
Dopamine	Inhibitor	4–400 ng/ml	1.14 ng/ml	–	Injection	[28]
Dopamine	Inhibitor	30–100 and 400–3000 ng/ml	5 ng/ml	135	Injections	[29]
Dopamine	Inhibitor	2.0–800 ng/ml	1.14 ng/ml	–	Injection	[30]
Folic acid	Enhancer/solid-phase reactor	0.01–15 µg/ml	3.5 ng/ml	30	Pharmaceuticals	[31]
Galic acid	Enhancer	8–1000 nM	5.6 nM	–	Tablets	[32]
Hydrazines	–	–	–	–	Pharmaceuticals	[33]
Indapamide	Inhibitor	10–1000 ng/ml	3.4 ng/ml	90	Tablets	[34]
Isoniazid	Inhibitor/solid-phase reactor	1–1000 ng/ml	0.35 ng/ml	30	Tablets	[35]
Ketotifen	Enhancer	0.01–1 µg/ml	5.7 ng/ml	–	Pharmaceuticals	[36]
Levodopa	Enhancers	0.5–50 ng/ml	0.12 ng/ml	–	Tablets	[37,38]
Methylodopa	–	1–100 ng/ml	0.57 ng/ml	–	–	–
Metronidazole	Enhancer, presence: ferrocyanide	2–400 µM	0.15 µM	–	Pharmaceuticals	[39]
Ornidazole	Inhibitor	0.2–10 µg/ml	0.05 µg/l	–	Tablets	[40]
Paracetamol	Inhibitor	40–1000 ng/ml	2.5 ng/ml	–	Tablets	[41]
Phentolamine	Enhancer	0.01–1 µg/ml	3.0 ng/ml	–	Injections, urine, plasma	[42]
Promazine	–	0.05–15 µg/ml	3 ng/ml	–	Tablets	[43]
Chlorpromazine	–	0.03–15 µg/ml	5 ng/ml	–	–	–
Resorcinol	Inhibitor/solid-phase reactor	9.2–920 ng/ml	3.5 ng/ml	–	Tinctures	[44]
Rutin	Enhancer, presence: ferrocyanide	0.1–2 µg/ml	0.03 µg/ml	–	Tablets	[45]
Rutin	Inhibitor/solid-phase reactor	1.0–400 ng/ml	0.35 ng/ml	40	Pharmaceuticals, human urine	[46]
Salbutamol	Sensitizer: MIP	0.05–10 µg/ml	16 ng/ml	–	Urine	[47]
Thiamine	Inhibitor/solid-phase reactor	0.2–4.0 µM	66 nM	30	Pharmaceuticals, human urine	[48]
Oxidant system: periodate in alkaline medium						
Adrenaline	–	0.02–10 µg/ml	7.0 ng/ml	–	–	[19]
Isoprenaline	Enhancer/solid-phase reactor	0.2–50 µg/ml	50 ng/ml	60	Injections	–
Cephalosporins						
Cefalexin	–	–	0.9 ng/ml	–	–	[49]
Cefaclor	–	–	0.4 ng/ml	–	–	–
Cefradine	–	–	10 ng/ml	–	–	–
Cefadroxil	Enhancers	–	10 ng/ml	–	Pharmaceuticals	–
Cysteine	Enhancer	0.01–1 µM	5 nM	–	Injection	[50]
Dobesilate	Inhibitor/solid-phase reactor	10–600 pg/ml	3.5 pg/ml	120	Pharmaceuticals, human urine	[51]
Dopamine	Enhancer	0.1–10 ng/ml	0.02 ng/ml	–	Injection	[52]
Hydralazine	Enhancer, MIP	2–800 ng/ml	0.6 ng/ml	–	Human urine	[53]
Isoniazid	Enhancer/solid-phase reactor	8.0–1000 nM	4.2 nM	60	Tablets	[54]
Penfluridol	Enhancer	0.04–10 µg/ml	9.2 ng/ml	–	Tablets	[55]
Peurarin	Enhancer	0.3–100 ng/ml	0.1 ng/ml	180	Nourishment, injections, human urine	[56]
Reserpine	Inhibitor/solid-phase reactor	1.0–300 ng/ml	0.3 ng/ml	120	Pharmaceuticals, biological fluids	[57]
Riboflavin	Enhancer/solid-phase reactor	0.04–200 ng/ml	0.02 ng/ml	120	Tablets, human urine	[18]

Table 1 (Continued)

Analyte	Action of the analyte/chemical system	Calibration range	LOD	Throughput (samples/h)	Sample	References
Rutin	Inhibitor/solid-phase reactor	0.1–30 ng/ml	0.03 ng/ml	120	Tablets, human urine	[58]
Thiamine	Inhibitor/solid-phase reactor	3.3–6700 nM	1.0 nM	100	Tablets, injection, human urine	[16]
Oxidant system: hydrogen peroxide in alkaline medium						
Acetylsalicylic acid	Enhancer	0.01–2 ng/ml	3 pg/ml	120	Pharmaceuticals, human urine, serum	[59]
Amikacin	Inhibitor, catalyst: Cu(II)	9.89–20 µg/ml	2.97 µg/ml	–	Pharmaceuticals	[60]
Amoxicillin	Inhibitor, sensitizer: Co ²⁺	8–40000 ng/ml	2.7 ng/ml	–	Capsules	[61]
Azithromycin	Enhancer	0.1–1000 µg/ml	0.04 µg/ml	120	Injections, human urine and serum	[62]
Captopril	Enhancer	5–5000 ng/ml	2 ng/ml	180	Tablets	[63]
Diethylstilbestrol	Enhancer, catalyst: Co(II)	0.1–4 µM	6.42 nM	20	Tablets	[10]
Domperidone	Enhancer	0.03–1.0 µg/ml	5.0 ng/ml	–	Tablets, serum	[64]
Estrogens:	Catalyst: tetrasulfonated manganese phthalocyanine	0.1–1.0 µM	51 nM	–	Injections, tap water	[65]
Estrone		0.09–1.0 µM	7.2 nM			
Estradiol		0.3–2.0 µM	65 nM			
Estrilol		2–100 µg/ml	1 µg/ml	120	Tablets	[9]
Methimazole	Inhibitors, catalyst Cu(II)	3–120 µg/ml	2 µg/ml			
Carbimazole		10–1000 µg/ml	4 µg/ml	120	Tablets	[66]
Risperidon	Catalyst	0.05–8 µg/ml	0.01 µg/ml	90	Tablets, injections	[67]
Thiamine	Enhancer					
Oxidant system: potassium permanganate in basic medium						
Doxycycline	Inhibitor	5–5000 ng/ml	2.0 ng/ml	–	Pharmaceuticals	[68]
Oxymetazoline	Inhibitor	1.88–200 ng/ml	1.88 ng/ml [69], 1.21 ng/ml [70]	–	Drops	[69,70]
Paracetamol	Inhibitor	25–250 nM	10 nM	–	Pharmaceuticals	[71]
Terbutaline	Enhancer	0.5–500 ng/ml	0.17 ng/ml	90	Pharmaceuticals, plasma and urine	[72]
Other oxidant systems						
Adenine	System: luminol–dichromate in alkaline medium, sensitizer: sodium dodecylbenzene sulfonate	0.438–2920 nM	0.246 nM	90	Human serum	[73]
Adrenaline	Adrenaline–luminol–polyphenol oxidase	1.0–25 µg/ml	0.2 µg/ml	20	Injections	[8]
Aminomethylbenzoic acid	Inhibitors of luminol– <i>N</i> -bromosuccinimide	0.02–1 µg/ml	7.0 ng/ml	–	Plasma	[74]
Aminophylline		0.1–7 µg/ml	34 ng/ml	–		
Ascorbic acid	Analytes reduce Fe ³⁺ to Fe ²⁺ which is detected with luminol–O ₂ , determination of mixture	0.06–6 µg/ml	0.03 µg/ml	–	Pharmaceuticals, human urine	[75]
L-Cysteine		0.4–40 µg/ml	0.2 µg/ml	–		
Catecholamines						
Adrenaline	Inhibitor of luminol–potassium chlorate	–	0.2 ng/ml	–	Injections	[76]
Noradrenaline			0.4 ng/ml			
Isoprenaline			0.7 ng/ml			
Dopamine			0.4 ng/ml			
Chlorpromazine	Ion pair chlorpromazine–tetrachloroaurate(III)	0.05–10 µg/ml	6 ng/ml	–	Tablets, injections, urine	[13]
Clindamycin	Inhibition, luminol–myoglobin	0.1–70 ng/ml	0.03 ng/ml	120	Capsules	[77]
Cobalamin (B ₁₂)	Enhancer, luminol–dissolved oxygen	0.2–1200 µg/ml	50 µg/ml	120	Injection, tablets, human serum, urine, egg, fish	[11]
Gentamicin	Sensitizer: electrooxidation of luminol	1.2–4000 ng/ml	0.8 ng/ml	–	Injection	[78]

Table 1 (Continued)

Analyte	Action of the analyte/chemical system	Calibration range	LOD	Throughput (samples/h)	Sample	References
Iodide	Use of gas diffusion, oxidation to iodine which reacted with luminol	0.1–1.0 µg/ml	–	60	Tablets, liquid medicine	[14]
Isoniazid	Inhibitor of luminol–K ₂ Fe(CN) ₆	1.4–5500 ng/ml	0.48 ng/ml	–	Tablets	[79]
Isoniazid	Sensitizer: electrooxidation of luminol	0.04–8 µM	28 nM	–	Injection	[80]
Isoniazid	Enhancer luminol–sodium dichloroisocyanurate (D) or trichloroisocyanuric acid (T)	4–200 ng/ml (D)	2 ng/ml (D)	65	Tablets	[81]
Isoniazid	Enhancer of luminol– <i>N</i> -bromosuccinimide (I) or <i>N</i> -chlorosuccinimide (II)	6–1000 ng/ml (T) 8–5000 ng/ml (I)	3 ng/ml (T) 4 ng/ml (I)	65	Tablets	[82]
Levodopa	Sensitizer: electrooxidation of luminol	6–2000 ng/ml (II) 0.4–2000 ng/ml	3 ng/ml (II) 0.2 ng/ml	–	Pharmaceuticals	[83]
Nifedipine	Enhancer of luminol–sodium persulfate	0.05–5.0 µg/ml	0.017 µg/ml	–	Tablets	[84]
Norfloxacin	Sensitizer: electrooxidation of luminol	0.01–200 µg/ml	4.0 ng/ml	–	Pharmaceuticals, urine	[85]
Novalgine (metamizole)	Inhibitor of luminol–dichromate/solid-phase reactor	0.05–50 ng/ml	0.02 ng/ml	60	Tablets	[17]
Ribavirin	Enhancer of luminol–sodium persulfate	0.01–1.0 µg/ml	4 ng/ml	–	Pharmaceuticals	[86]
Thiamine (B ₁)	Inhibitor, luminol–electrogenerated BrO [–]	0.01–6.0 µg/ml	3.2 ng/ml	–	Tablets	[87]

intensity. A metal cation forming a metalphthalocyanine or metalloporphyrin complex may act as a CL catalyst as demonstrated with Co(II) in the CL assay of diethylstilbestrol [10]. The catalytic effect of Co(II) was also used in the CL determination of vitamin B₁₂ (cobalamin) [11] after releasing Co(II) from the vitamin molecule by acidifying the analyte solution.

The selectivity of CL analysis can be improved by solid-phase extraction with specific recognition using molecular imprinted polymers (MIPs) in continuous-flow analytical methodologies. Appropriate MIPs are prepared by copolymerization of functional monomer with cross-linker in the presence of template molecules to produce three-dimensional network polymers. Removal of the template molecules results in a functional polymeric matrix with recognition sites complementary in size, shape and functionality to the template molecule. The MIP is packed in a glass tube that serves as a flow cell. The analyte (template molecule) is adsorbed (pre-concentrated) in the flow cell and the other substances except of the analyte are washed out. This MIP technique has been employed for the selective CL determination of adrenaline with use of hexacyanoferrate(II)/hexacyanoferrate(III) reagent [12] and other drugs (see Tables 1, 3 and 5).

Another way of increasing selectivity of CL determination is the use of solvent extraction in micellar aqueous–organic systems. A good example is the CL determination of chlorpromazine hydrochloride [13], which is based on the

dichloromethane solvent extraction of ion-pair complex of tetrachloroaurate(III) with chlorpromazinium cation and luminol CL detection in a reversed micellar medium formed by the cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide in a dichloromethane–cyclohexane–aqueous carbonate buffer system. The ion-pair complex produced a CL signal when it entered the reversed micellar water pool.

A gas-diffusion flow-injection (GD–FI) system was designed for selective CL determination of iodide. Iodide was oxidized to elementary iodine in a donor stream (oxidant + water); the I₂ diffused through a PTFE membrane into an acceptor stream of iodide solution and reacted with a stream of luminol to produce CL [14].

Use of substrate-specific enzymes is another possibility for attaining selectivity of CL assays. Selective CL determination of beta-glucose [15] was based on the on-line oxidation of glucose by glucose oxidase in the presence of dissolved molecular oxygen resulting in the formation of hydrogen peroxide which reacted subsequently with luminol.

Besides conventional aspiration or pumping the reagents in the FIA or SIA system, special technique for introducing CL reagents has been devised. Reagents were separately immobilized on a suitable support (resin) and they were successively eluted in the flow manifold during the analysis. The resin was packed into a column (flow sensor or solid-phase reactor) placed at the merging point of analyte, carrier or other reagent streams

[16–18] or just in front of the detection window [19]. The advantages of such system are operational convenience, simplicity of detection devices as well as lower reagent consumption. On the other hand the capacity of the column packing is limited, the immobilized reagents are spent after some time and the column packing must be renewed (shorter lifetime of the sensor).

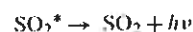
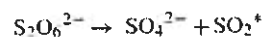
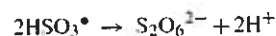
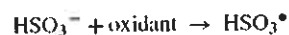
A secondary CL emission phenomenon was observed in determination of menadion [20]. After finished CL reaction between luminol and excess of potassium periodate, the analyte menadion was added and so-called secondary CL emission was observed. The oxidized form of menadion presumably transfers its energy to once deactivated 3-aminophthalate which again appears in excited state. When returning to the ground state the energy emitted is proportional to concentration of menadion.

The CL methods using luminol as reagent were proposed for the assay of various pharmaceuticals with different structures and pharmacological effects. Phenethylamine group drugs are typical representatives of such analytes determined (see Table 1).

3. Sulphite system

The reaction of sulphite with strong oxidants such as permanganate, Ce(IV) in acid media and electrogenerated Mn(III) is accompanied by a weak CL that can be sensitized by some

organic compounds (see Table 2). The excited species formed by the oxidation of sulphite is probably sulphur dioxide [88–90] in accordance with the following mechanism:



The energy of the excited SO_2^* molecule can be easily transferred to a fluorescent molecule (fluorophore).

The sulphite CL system was especially useful in determination of fluoroquinolones. The CL signal can be considerably enhanced in the presence of trivalent lanthanoid family ion (LI) [89,91–94] as observed in the CL determination of the quinolone (Q) grepafloxacin [89]. In the absence of LI the transfer of energy from SO_2^* to Q resulted in subsequent emission of luminescence of Q^* . In the presence of LI a complex with quinolone LI(Q) was formed. The energy from SO_2^* was transferred successively to ligand (quinolone) and then by an intramolecular energy-transfer process to LI; the energy of LI(Q^*) was emitted at characteristic wavelength of the LI (here Tb^{3+} 490, 546 and 590 nm).

Table 2
CL systems based on sulphite oxidation/FIA

Analyte	Oxidation system/technique	Calibration range	LOD	Throughput (samples/h)	Sample	Reference
Benzamides:	Acidic Ce(IV)	0.05–2.5 $\mu\text{g/ml}$	0.01 $\mu\text{g/ml}$	190		[90]
Sulpiride						
Sulopiride		0.1–2.5 $\mu\text{g/ml}$	0.01 $\mu\text{g/ml}$	150	Tablets, capsules, ampoules, urine, plasma	
Tiaprside		0.01–1.5 $\mu\text{g/ml}$	0.01 $\mu\text{g/ml}$	144		
Ciprofloxacin	Acidic Ce(IV), sensitizer: Tb^{3+}	9.0–1000 nM	22 pM	–	Tablets, capsules	[97]
Dexamethazone	Electrogenerated Mn(III)	0.1–10 $\mu\text{g/ml}$	70 ng/ml	–	Pharmaceuticals	[98]
Fluoroquinolones:	Acidic Ce(IV), sensitizer: Eu^{3+}	0.5–3.5 $\mu\text{g/ml}$	0.100 $\mu\text{g/ml}$	–	Tablets	[92]
Levofloxacin						
Moxifloxacin	Eu^{3+}	0.2–3.0 $\mu\text{g/ml}$	0.035 $\mu\text{g/ml}$	–		
Trovafloxacin	Tb^{3+}	0.0008–0.4 $\mu\text{g/ml}$	0.008 $\mu\text{g/ml}$	–		
Grepatofloxacin	Acidic Ce(IV), sensitizer: Tb^{3+}	0.05–2 $\mu\text{g/ml}$	0.01 $\mu\text{g/ml}$	–	Tablets and human urine	[89]
Iproniazid	Acidic Ce(IV)	0.1–4.0 $\mu\text{g/ml}$	3 ng/ml	121	Synthetic sample, urine	[99]
Lomefloxacin	UV-irradiated sample, Ce(IV) in HCl, sensitizer: Tb^{3+}	0.9–10000 nM	0.22 nM	–	Tablets, serum, urine	[94]
Metoprolol	Ce(IV) in sulphuric acid	0.015–7.3 μM	4.7 nM	180	Tablets, human urine	[100]
Norfloxacin	Acidic Ce(IV), sensitizer: Tb^{3+}	9–1000 nM	45 pM	–	Capsules, human serum, urine	[91]
Ofloxacin	PbO_2 in sulphuric acid/solid-phase reactor	0.2–10 $\mu\text{g/ml}$	78 ng/ml	–	Tablet, capsule, injection	[96]
Papaverine	Acidic permanganate	0.2–10 μM	0.1 μM	–	Tablets	[88]
Papaverine	Acidic Ce(IV)	0.1–10 μM	87 nM	–	Pharmaceuticals and biological fluids	[101]
Pipemidic acid	Permanganate in tetraphosphoric acid	0.1–80 $\mu\text{g/ml}$	30 ng/ml	–	Tablets	[102]
Pipemidic acid	Sodium bisnuthate in sulphuric acid/solid-phase reactor	0.1–10 $\mu\text{g/ml}$	62 ng/ml	60	Tablets	[95]
Sparfloxacin	UV-irradiated sample, acidic Ce(IV), sensitizer: Tb^{3+}	0.1–10 μM	25 nM	–	Tablets, capsules	[93]

A sulphite–sodium bismuthate (oxidant) CL system was used for determining pipemidic acid [95] in acidic medium. Sodium bismuthate was immobilized inside a CL flow cell as a solid-phase oxidant. Pipemidic acid is a fluorogenic compound that could sensitize the weak CL emission from the sulphite–bismuthate reaction. A similar solid-phase reaction system was proposed for the CL assay of ofloxacin [96] (fluorophor) with immobilized lead dioxide as oxidant.

4. Direct CL methods

Recently special attention was paid to looking for new direct CL reactions. Generally, the CL reagent is a strong or moderate oxidant such as potassium permanganate, tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(III) complex, potassium hexacyanoferrate(III), Ce(IV), hydrogen peroxide, oxygen or *N*-bromosuccinimide among others. Other less frequently used CL reagents are bromine or sodium hypochlorite. The CL emission can be usually enhanced by using a catalyst, an organized medium or a sensitizer.

The direct CL strategy has attracted the attention of some authors [103,104] dealing with molecular connectivity calculations applied to predict the CL behavior of organic substances, pharmaceuticals and pesticides when reacting with common strong oxidants in liquid phase and first non-empirical rule for the prediction of the CL behavior of organic compounds was devised. The success in prediction was about 93% for CL behavior of pharmaceuticals and pesticides and 100% for phenols and polyphenols. The calculations were also applied to ergot alkaloids [105] and a review [106] concerning this topic was published.

4.1.1. Oxidation with potassium permanganate

Potassium permanganate is the most common oxidant used in CL reactions; recently cephalosporin and penicillin class antibiotics appear among the drugs determined most frequently with this reagent by the FIA–CL technique (see Table 3). The emitting molecule is under discussion. A comprehensive review by Hindson and Barnett concerning a wide range of analytical applications of permanganate in CL reactions [107] postulated excited Mn(II) or its complexes, singlet oxygen, sulphur dioxide, fluorescent oxidation products of the analyte, etc. as CL-emitting species. A further article was devoted to investigation of the origin of CL in systems involving Mn(III), Mn(IV) and Mn(VII) in phosphate solutions [108]. It was confirmed that the emitter is elicited from the oxidant and that it is most probably the excited Mn(II).

Judging by the number of published articles sulphuric acid or polyphosphoric acid is the preferred medium for permanganate-based CL reactions. However, the suitability of sulphuric or polyphosphoric acid is also subject of controversy. The optimization of the acidic medium mostly shows that the use of sulphuric acid leads to better reproducibility. The role of polyphosphoric acid is double: on one hand, it provides the required acidic medium for the oxidation, and on the other hand it acts as promoter of the CL since it most likely stabilizes reac-

tion intermediates [109]. Similar role is played by polyphosphate (hexametaphosphate) in sulphuric acid medium [110,111].

The presence of chemical additives such as sensitizers or organized media can increase the emission intensity even by several orders of magnitude. Some surfactants (Tween 60 [109], benzalkonium chloride [112]) protect the microenvironment of CL emitter through formation of micelles or they can facilitate energy transfer [109]. There are some other chemicals of non-surfactant character, such as β -cyclodextrin, that also protect the emitter and minimize the non-electromagnetic emission pathway during relaxation of the excited species [113].

On the other hand, there is variety of other substances which can increase the CL intensity. Many fluorophores have been tested and proposed in different drug determinations. Quinine [112,114–116] and formic acid [117] were utilized as fluorophores where the energy from excited state of intermediate or product is transferred to this fluorescing compound which is the final emitter (glutaraldehyde [118], formaldehyde [119–125]). Cephalosporines [126] were determined by permanganate-induced CL enhanced by glyoxal as sensitizer.

An attempt was made to solve the problem of CL drug determination in complicated matrices such as human serum by using on-line solid-phase extraction and SIA with CL detection [110]. The authors determined salbutamol that was initially adsorbed from the matrix on a cartridge packed with silica-gel (modified with carboxylic acid) and then eluted by sulphuric acid; the CL determination of eluted salbutamol was performed by oxidation with permanganate in sulphuric acid medium.

The transformation of non-chemiluminescent compounds into chemiluminescent intermediates by prior UV-irradiation is a real possibility how to achieve CL reaction. Photo-induced CL was employed for the determination of chloramphenicol [127] and sulphonamides [128]. A screening test for the development of photo-induced FIA–CL of pharmaceuticals has been also reported [129].

4.1.2. Oxidation by (2,2'-bipyridine)ruthenium(III) complex

A frequently applied CL reaction uses tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(III) complex ($\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$) as reagent. This rather unstable molecule should be freshly prepared just prior the reaction or in situ. A variety of methods have been employed to obtain active $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$ by oxidation of relatively stable $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ including chemical, photochemical and electrochemical oxidation [143]. An analyte is oxidized by the $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$ to produce excited $[\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}]^*$ species emitting CL at around 600 nm [143].

The CL is generated by the reaction with a reductant (X_{red}) as follows:

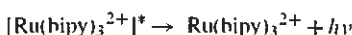
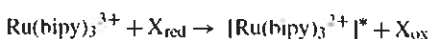
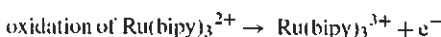


Table 3
Direct oxidation of analyte by potassium permanganate in acidic media

Analyte	CL reaction/flow: methodology	Calibration range	LOD	Throughput (samples/h)	Sample	Reference
Amidopyrine (=Aminopyrine)	Sensitizer: formaldehyde/FIA	0.1–80 µg/ml	30 ng/ml	–	Injection solutions	[119]
Aminophenazone	Sensitizer: quinone/FIA	0.05–10 µg/ml	0.02 µg/ml	90	Pharmaceuticals	[114]
Amoxicillin	Degradation of ampicillin sensitizer: formaldehyde/FIA	0.04–20 µg/ml	9.1 ng/ml	–	Capsules	[130]
Ascorbic acid	FIA, solid-phase reactor	0.05–10 µg/ml	5 ng/ml	120	Tablets, vegetables	[131]
Ascorbic acid	Oxidation by soluble Mn(IV) or permanganate/FIA or SLA	Mn(IV): 0.1–50 µM (FIA), SLA: 0.05–50 µM; Mn(III): 0.01–5 µM (FIA), 0.5–5 µM (SLA)	Mn(IV): 50 nM (FIA), SLA: 5 nM (SLA)	180	Tablets, injections	[132]
Brineine	MIP/FIA	0.005–1 µg/ml	2 ng/ml	–	Urine	[133]
Cefadroxil	Sensitizer: formaldehyde/FIA	0.05–40 µg/ml	25 ng/ml	120	Pharmaceuticals	[134]
Cephalosporins: Cefalexin	Sensitizer: glyoxal/FIA	0.01–1 µg/ml	10 ng/ml	–	Capsules, tablets, injections	[126]
Cefadroxil	UV-irradiation/FIA	0.1–5 µg/ml	2 ng/ml	60	Collyria, pomade	[127]
Cefazolin	Enhancer: ethanol, Tween 60, polyphosphoric acid medium/FIA	0.1–5 µg/ml	30 ng/ml	130	Tablets	[109]
Chloramphenicol	Enhancer: quinone/FIA	0.02–2 µg/ml	0.01 µg/ml	120	Pharmaceuticals	[115]
Cinnarizine	Sensitizer: formaldehyde/FIA	0.05–2 µg/ml	0.02 µg/ml	–	–	–
Cysteine	Sensitizer: formaldehyde/FIA	0.05–2 µg/ml	0.02 µg/ml	–	–	–
N-Acetylsacchine	Sensitizer: formaldehyde/FIA	0.05–2 µg/ml	0.006 µg/ml	–	–	–
Glutathione	Sensitizer: formaldehyde/FIA	0.02–1 µg/ml	0.07 µg/ml	–	–	–
Captopril	Sensitizer: formaldehyde/FIA	0.1–100 µg/ml	5 ng/ml	–	–	–
Dobutamine	Sensitizer: formaldehyde/FIA	0.01–2 µg/ml	2.61 ng/ml	–	–	–
Edrophonium	Sensitizer: formaldehyde/FIA	0.005–1.75 µg/ml	1.08 ng/ml	–	–	–
Diethylstilbestrol	Enhancer: formaldehyde/FIA	0.02–5 µg/ml	6.28 ng/ml	–	–	–
Flaxseed	Mn(IV) in basic medium/FIA	0.01–5.0 µg/ml	7.0 ng/ml µg/ml	–	–	–
Isoniazid	Sensitizer: formaldehyde/FIA	0.06–40 µg/ml	0.03 µg/ml	–	–	–
Metoclopramide	Sensitizer: formaldehyde/FIA	0.4–100 µg/ml	0.2 µg/ml	–	–	–
Metoclopramide	Sensitizer: formaldehyde/FIA	0.005–1.75 µg/ml	1.08 ng/ml	–	–	–
Penicillins	Sensitizer: formaldehyde/FIA	0.02–5 µg/ml	6.28 ng/ml	–	–	–
Phenoxymethylpenicillin, Amoxicillin, Ampicillin, Ampicillin sodium	Sensitizer: formaldehyde/FIA	0.01–1.0 µg/ml	0.05 µg/ml	–	–	–
Phenolamine	Sensitizer: formaldehyde/FIA	0.01–5.0 µg/ml	0.03 µg/ml	–	–	–
Phenylephrine	Under 80 °C/FIA	0.05–8 µg/ml	0.05 µg/ml	134	Formulations, plasma, urine	[123]
Proprietary	SEA	15.58–1809 µM	5 ng/ml	–	Pharmaceuticals	[138]
Proprietary	Presence: ketous ions, polyphosphoric acid/FIA	1.0–17.5 µg/ml	–	–	Tablets	[139]
Salbutamol	Sensitizer: hexametaphosphate/SLA	0.4–10 µg/ml	0.1 µg/ml	–	Tablets	[141]
Salicylic acid	Sensitizer: formaldehyde/FIA	0.05–10 µg/ml	0.03 µg/ml	42	Human serum, urine	[110]
Sulphonamides	UV-irradiation/FIA	0.5–1000 µM	0.3 µM	–	Liquid medicine	[124]
Sulphonamides (sulfacetamide and Sulfathiazole)	Sensitizer: formaldehyde/SLA	0.06–8 µg/ml or 0.06–100 µg/ml	30 ng/ml or 80 ng/ml	60	Tablets, capsules	[128]
Tamoxifen	Sensitizer: formaldehyde/SLA	0.01–0.3 mM	–	120	Eye drops, tablets	[118]
Tetracycline	Sensitizer: quinone/SLA	0.5–20 µg/ml	10 ng/ml	54	Pharmaceutical and zinkinc formulations, human urine, surface water	[116]
Trimethoprim	Sensitizer: formaldehyde/FIA	0.1–20 nM	0.03 nM	–	Study of protein binding in vitro	[125]
Trimethoprim	Sensitizer: hexametaphosphate/SLA	20–100 µg/ml	0.1 µg/ml	120	Tablets	[111]
Trimethoprim	MIP/FIA	0.05–5 µg/ml	0.02 µg/ml	–	Pharmaceuticals, body fluids	[142]

Table 4
CL systems based on ruthenium complex

Analyte	Oxidation	Calibration range	LOD	Throughput (samples/h)	Sample	Ref.
Amiodarone	UV-irradiation and peroxodisulphate/FIA	3.0–60.0 µg/ml	0.28 µg/ml	120	Pharmaceuticals	[146]
Cefadroxil	Electrochemically/FIA	0.05–100 µM	–	–	Capsules	[145]
Cephalosporins: Cefoxitin, Cefazolin, Cefalexin, Cefadroxil, Cefaclor, Cefoperazone	Permanganate, presence of perchloric acid, catalysed by Mn(II)/FIA	≈0.1–10 µg/ml	≈0.3–0.08 µg/mB0	–	Pharmaceuticals	[147]
Cefprozil	Permanganate in sulphuric acid, sensitizer, quinone/FIA	0.1–3.0 µg/ml	5 µg/ml	120	Tablets	[148]
L-Cysteine	UV-irradiation and peroxodisulphate/FIA	2–500 µM	0.5 µM	240	Pharmaceuticals	[144]
L-Cystine	Permanganate in sulphuric acid/FIA	1–200 µM	1.0 µg/ml	–	Tablets, urine, serum	[149]
Enalapril	Ce(IV) in sulphuric acid/FIA	0.005–0.2 and 0.7–100 µg/ml	–	–	Tablets, urine, plasma	[150]
Fluoroquinolones: Ofloxacin	Permanganate in sulphuric acid/FIA	0.003–0.7 µg/ml	5.5 nM	98	Tablets, syrup, urine, serum	[151]
Norfloxacin		0.05–7 µg/ml	3.1 nM	35	Human serum	[152]
Ciprofloxacin		0.05–6 µg/ml	26 nM	45	Tablets	[153]
Metoclopramide	Permanganate in sulphuric acid/FIA	0.005–3.5 µg/ml	1 ng/ml	–	–	[154]
Naproxen	Lead dioxide in sulphuric acid/FIA	0.02–6 µM	10 nM	–	–	–
Paracetamol	Permanganate in sulphuric acid, sensitizer, Mn(II)/FIA	0.3–50.0 µg/ml	0.2 µg/ml	90	–	–
Pyrolizidine alkaloids: Heliotrine, Retronecine, Supinine, Monocrotaline, Echmatine, N-oxide	Use of Ru(II) complex and Ru(II) complex immobilized; oxidation by permanganate/SIA and FIA	–	–	–	–	–
Tetracycline	Permanganate in nitric acid, catalytic Mn(II)/FIA	50–500 µM	2.0 µM	50	Tablets, ointment	[155]
Chlortetracycline			1.9 µM			
Oxytetracycline			1.0 µM			
Thioxanthens: Zuclopendithoxol	Ce(IV) in sulphuric acid/FIA	0.002–6 µg/ml	4.2 nM	116	Tablets, ampoules, spiked urine, plasma	[156]
Flupentixol		0.5–15 µg/ml	20 nM	133		
Thiothixene		0.05–7.5 µg/ml	45 nM	100		
Thyroxine	Enhancer: immobilized alcohol dehydrogenase, presence of NADH/FIA	0.05–1 µM	0.05 µM	80	Tablets	[157]

Table 5
Other CL methods/FIA

Analyte	CL reaction/special technique	Calibration range	LOD	Throughput (samples/h)	Sample	Reference
Oxidation by ferricyanide in alkaline media						
Cimetidine	Sensitizer: Tween 80	0.1–500 µg/ml	20 ng/ml	–	Tablets, injections	[164]
Dihydralazine	Sensitizer: eosin Y	0.02–2.8 µg/ml	12 ng/ml	–	Tablets	[165]
Dobutamine	–	0.5–100 µg/ml	0.3 µg/ml	–	Medicine	[166]
Ergonovine	Solid-phase reactor	0.005–1.0 µg/ml	2.6 ng/ml	–	Injections, urine	[167]
Ergot alkaloids (Ergotamine)	Sensitizer: dioxane, 70 °C	0.1–500 ng/ml	0.6 µg/ml	73	Tablets	[105]
Folic acid	–	0.1–21 µg/ml	0.03 µg/ml	30	Pharmaceuticals	[168]
Isoniazid	–	0.05–2 µg/ml	0.01 µg/ml	120	Pharmaceuticals	[169]
Rifampin	–	0.1–30 µg/ml	0.06 µg/ml	–	Capsules, ocellula	[170]
Rutin	Sensitizer: ethanol	1–100 µg/ml	0.34 µg/ml	60	Pharmaceuticals	[171]
Terbutaline	Sensitizer: rhodamine 6G	0.01–1.2 µg/ml	0.0067 µg/ml	–	Tablets	[172]
Tyrosine	Sensitizer: formic acid, organised medium (β-cyclodextrin)	1.0–10 µg/ml	50 ng/ml	98	Synthetic formulation	[113]
Oxidation by Ce(IV) in acidic media						
Cephalexin	Temperature degradation of analyte, sensitizer: rhodamine 6G	0.1–10 µg/ml	0.06 µg/ml	–	Capsules, tablets	[173]
Cephadrine	Thermal degradation of analyte, sensitizer: rhodamine 6G	0.1–40 µg/ml	0.05 µg/ml	–	Capsules	[174]
Chlorpromazine	Sensitizer: rhodamine 6G	0–10 µg/ml	6.5 ng/ml	–	Tablets, injection, plasma, urine	[175]
Floxacin	Sensitizer: Tb ³⁺	2–80 nM	0.83 nM	–	Tablets, urine	[176]
Lomefloxacin	Sensitizer: rhodamine 6G	0.1–15 µg/ml	0.06 µg/ml	–	Capsules	[177]
Perphenazine	–	0.1–70 µg/ml	80 ng/ml	–	Tablets	[178]
Peprarin	Sensitizer: rhodamine 6G	1.3–800 ng/ml	0.84 ng/ml	120	Injection	[179]
Phentolamine	Sensitizer: rhodamine 6G	1–1000 ng/ml	0.4 ng/ml	–	Injection, biological fluids	[180]
Thiazides: Indapamide	UV-irradiation	0.5–12 µg/ml	–	65	Pharmaceuticals	[181]
Metolazone	–	0.5–12 µg/ml	–	–	–	–
Hydroflumethazide	–	0.5–12 µg/ml	0.06 µg/ml	–	–	–
Chlorthalidone	–	0.5–12 µg/ml	0.005 µg/ml	–	–	–
Bendroflumethazide	–	0.5–5 µg/ml	–	–	–	–
Hydrochlorothiazide	–	0.5–5 µg/ml	–	–	–	–
Oxidation by <i>N</i> -bromosuccinimide in alkaline media						
Adrenaline	–	6–200 µg/ml	6 µg/ml	40	Pharmaceuticals	[182]
Amino acids: Glycine	Increased reactivity by humic acid	1–30 µg/ml	0.2 µg/ml	115	Emulsion, injection	[183]
Arginine	–	–	0.25 µg/ml	–	–	–
Meloxicam	Sensitizer: fluorescein	0.22–28 µM	77 nM	144	Pharmaceuticals	[184]
Metformin	Sensitizer: fluorescein, tensoactives cetyltrimethylammonium bromide	0.007–30 µg/ml	2.3 ng/ml	90	Pharmaceuticals	[185]
Moroxydine	Presence of dichlorofluorescein, cetyltrimethylammonium chloride	0.01–100 µg/ml	3.0 ng/ml	–	Tablets	[186]
Phenformin	Sensitizer: fluorescein, tensoactives cetyltrimethylammonium bromide	0.006–10 µg/ml	2 ng/ml	90	Tablets	[187]
Phenformin	Sensitizer: fluorescein, tensoactive cetyltrimethylammonium bromide	0.01–30 µg/ml	3.4 ng/ml	–	Tablets	[188]
Electrogenerated oxidants						
Amidopyrine (=Aminopyrine, Aminophenazon)	Mn(II)	0.5–100 µM	0.2 µg/ml	–	Injections	[159]
Captopril	Mn(II)	0.3–100 µM	80 nM	–	Tablets	[160]

Table 5 (Continued)

Analyte	CL reaction/special technique	Calibration range	LOD	Throughput (samples/h)	Sample	Reference
Captopril	Ag(II) in acidic medium	0.02–10 µg/ml	6 µg/ml	60	Pharmaceuticals	[161]
Dexamethasone	Co(III) in sulphuric acid	1–20 µg/ml	0.32 µg/ml	–	Injections	[162]
Chlortetracycline	[Cu(HIO ₆) ₂] ⁵⁻	0.1–100 µg/ml	53 ng/ml	60	Urine	[163]
Other oxidants						
Analgin (Metamizol)	Oxidation by manganese dioxide in acidic medium, sensitizer: rhodamine 6G/flow sensor	0.04–1 mg/ml	27 µg/ml	120	Dissolution tests of tablets	[189]
Ascorbic acid	Oxidation by soluble Mn(IV), sensitizer: formaldehyde	0.06–20 µM	0.02 µM	–	Tablets, injections	[190]
Hemiu	Oxidation by H ₂ O ₂ in NaOH, sensitizer: Rhodamine B, sodium dodecyl sulphate	0.86–860 nM	86 pM	100	Tablets, animal blood	[191]
Indapamide	Oxidation by soluble Mn(IV), sensitizer: formaldehyde, MIP	0.02–5.0 µg/ml	8 ng/ml	–	Urine	[192]
Isoniazid	Oxidation by periodate in basic medium	0.5–100 µg/ml	0.16 µg/ml	120	Dissolution tests of tablets	[193]

In recent years chemical oxidation of Ru(bipy)₃²⁺ to Ru(bipy)₃³⁺ has been achieved with Ce(IV) in acidic medium, permanganate in acidic medium or by lead dioxide as oxidants (see Table 4).

The drugs determined with Ru(bipy)₃³⁺ as reagent contain typically nitrogen in their structure (mainly heterocyclic compounds and primary, secondary and tertiary amines) except of naproxen which is derivate of 2-arylpropionic acid (profen).

Generation of Ru(bipy)₃³⁺ was carried out by photochemical oxidation of Ru(bipy)₃²⁺ (involving UV-irradiation in the presence of peroxodisulphate) in the CL determination of L-cysteine and L-cystine [144]. Direct CL determination of cysteine was possible whereas cystine had to be preliminarily transformed to cysteine by using a reduction column.

Electrochemically generated Ru(bipy)₃³⁺ was used for the CL determination of antibiotic cefadroxil [145]. The flow cell of the proposed system contained a platinum working electrode, a silver chloride reference electrode and a steel needle as an auxiliary electrode. Cefadroxil was oxidized by Ru(bipy)₃³⁺ generated from Ru(bipy)₃²⁺ in situ on the surface of the platinum electrode.

4.1.3. Other oxidation CL reactions

In addition to permanganate and Ru(bipy)₃³⁺ some other oxidants, namely [Fe(CN)₆]³⁻, *N*-bromosuccinimide or periodate in alkaline medium or Ce(IV), manganese dioxide and soluble manganese(IV) in acidic medium were utilized as reagents in CL assay of drugs (see Table 5).

Some CL reactions can occur at the surface of an electrode when the CL reagent (often an unstable species) is produced from a passive precursor in a flow system. Such electro-chemiluminescence analyses are characterized by good sensitivity but they may suffer from some drawbacks such as electrode fouling, narrow linear range due to small area of the

working electrode, poor repeatability and complicated design of the electrochemical/CL flow cell. In the recent years the electrogenerated oxidants applied in the CL analysis of drugs were hydrogen peroxide [158], Mn(III) [159,160], Ag(II) [161], Co(III) [162] and [Cu(HIO₆)₂]⁵⁻ [163].

5. Miscellaneous reactions

This section is dealing with CL assays that could not be included in the previous sections because the nature of the CL reaction utilized is different (Table 6). Song and coauthors [194] devised a CL method for the assay of fluoroquinolones that enhanced weak CL from peroxyxynitrous acid (nitrite + hydrogen peroxide in acidic medium). The peroxyxynitrous acid was converted into a metastable excited species OHOON*. Fluoroquinolones served as energy-transfer species responsible for CL emission.

The oxidation of peroxyoxalate by hydrogen peroxide gives an intermediate which may transfer its energy to other molecules. The reaction is suitable for determination of fluorophores or compounds labeled with fluorescent tags. Thus albumin [195] was derivatized off-line with fluorescamine in acetone and bis(2,4,6-trichlorophenyl)oxalate (in acetonitrile) was oxidized with hydrogen peroxide to form an intermediate which transferred its excitation energy to the labeled albumin in the presence of sodium dodecyl sulphate and imidazole (bases such as imidazole, pyridine, TRIS and triethylamine catalysed the peroxyoxalate CL reaction).

Another CL reaction was used for the determination of ethamsylate (2,5-dihydroxybenzenesulfonic acid with diethanolamine) [196]. This analyte is hydrolyzed in alkaline medium to 2,5-dihydroxybenzenesulfonate and diethylamine. A strong CL was generated in the presence of dissolved oxygen, Tween 80 and rhodamine 6G (energy-transfer reagent).

Table 6
Miscellaneous reactions/FIA

Analyte	CL reactions/special technique	Calibration range	LOD	Throughput (samples/h)	Sample	Reference
Albumin	Derivatized by fluorescamine: bis(2,4,6-trichlorophenyl)oxalate in acetonitrile-H ₂ O ₂ system	0.31–12 µg/ml	—	—	Pharmaceuticals and biological fluids	[195]
Amidopyrine (=Aminopyrine, Aminopheazone) Analgin (metamizol)	Na ₂ S ₂ O ₄ -K ₂ Cr ₂ O ₇ system in H ₂ SO ₄	0.2–80 µg/ml	60 ng/ml	—	Tablets	[197]
Antipyrin (Fenazon) Cetiraxone	Polyethylene-glycol-400-rhodamine 6G system in acidic medium NaIO ₄ -H ₂ O ₂ system in H ₃ PO ₄ Inhibition of acridine orange-potassium permanganate system	0.01–10 µg/ml 0.1–70 µg/ml 2–20 µg/ml	0.003 µg/ml 23 ng/ml 8 ng/ml	—	Pharmaceuticals Pharmaceuticals Powder injection preparations	[198] [199] [200]
Ethamsylate	Hydrolytic product (in NaOH) reacts with dissolved oxygen in Tween 80; sensitizer: rhodamine 6G	0.05–2.0 µg/ml	0.02 µg/ml	—	Tablets, injection	[196]
Fluoroquinolones Ciprofloxacin Norfloxacin Ofloxacin Gentamicin	Enhancers of nitrite-hydrogen peroxide system in acidic medium	0.1–10 µM 0.1–10 µM 0.3–30 µM	45 nM 59 nM 110 nM	—	Tablets, eye drops	[194]
Isoprenaline Pentoxifylline Pipemidic acid Piroxicam	Gentamicin derivatized with <i>o</i> -phthalaldehyde; peroxyoxalate system; catalytic: imidazole, dodecyl sulfate Peroxide-periodate-Cu(II), 80 °C Sodium hypochlorite-hydrogen peroxide system Sodium hydroxide/potassium permanganate system in tetraphosphoric acid Quencher of acridine orange-permanganate system in basic medium	3.93–30 µg/ml 1–700 ng/ml 3.0–0.03 µM 0.01–10 µg/ml	1.18 µg/ml 0.4 ng/ml 28 nM 3.3 ng/ml	—	Pharmaceuticals Injection Tablets Pharmaceuticals	[201] [202] [203] [204]
Propamolol Reserpine Rufloxacin Salbutamol Tetracycline	Sensitizer with Eu(III) (complex) of Ce(IV)-sulfurous acid Inhibition of N-bromosuccinimide/fluorescein system in alkaline condition Enhancers of oxidation of electrogenerated bromine with hydrogen peroxide	10–700 µg/ml up to 1.0 µg/ml 0.001–10 nM 20–500 nM 0.08–10 µg/ml	4.5 µg/ml 37.4 ng/ml 0.27 µM 5 nM 26 ng/ml	—	Pharmaceuticals Injection Tablets Capsules, human serum Tablets Pharmaceuticals	[205] [206] [207] [208] [209]
Oxytetracycline Chlortetracycline Trimethoprim Tryptophan	Thio-sulfate/permanganate system in sulphuric acid Peroxidation and epoxidation by peroxytrous acid, subsequent decomposition of dioxetane	0.03–50 µg/ml 0.2–2.4 µg/ml 0.1–50 µg/ml 0.1–10 µg/ml 0.6–30 µM	10 ng/ml 70 ng/ml 150 ng/ml 38 ng/ml 0.18 µM	60 — — — 50	Pharmaceuticals Tablets Injection, human serum Tablets Injection, human serum	[158] [210] [211]

6. Conclusions

Chemiluminescence is a very attractive detection technique mostly due to the instrument simplicity, low-detection limits and wide calibration ranges. At present the “marriage” of CL detection and automated flow techniques such as FIA and SIA stimulated more extensive use of CL in drug analysis. Other flow methodologies not considered in this review (multi-commutation, multi-syringe, stopped-flow, multi-pumping, etc.) have not yet contributed significantly to the analysis of drugs.

The discovery of new direct selective CL reactions can potentially increase the number of analytes of pharmaceutical interest which could be determined through chemiluminescence. To succeed in such developments a deeper knowledge of mechanisms of the CL reactions is pre-requisite. In the authors' opinion further progress in the field of electro-chemiluminescence concept can probably contribute to further improvement of selectivity of CL assays, while wider implementation of automated on-line separation techniques in this sense is straightforward.

Most of the reported CL drug assays are performed by means of lab-made flow luminometers which makes difficult comparison of the analytical numbers of merit of methods devised in different laboratories. Moreover, a CL reaction which could be used as a CL standard still remains a challenge opened to CL researchers.

Acknowledgements

The authors gratefully appreciate financial support from Charles University Grant Agency GAUK, grant no. 85107-B/2007 as well as from Research Project MSM 0021620822.

References

- [1] A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens, X. Zhang, F. Alés, L. Gámiz, *Ars Pharm.* 42 (2001) 81–107.
- [2] A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens, *Chemiluminescence in Analytical Chemistry*, Marcel Dekker, Inc., New York, 2001.
- [3] Y. Fuster Mestre, L. Lahuerta Zamora, J. Martínez Calatayud, *Luminescence* 16 (2001) 213–235.
- [4] J. Ruzicka, E.H. Hansen, *Anal. Chem.* 72 (2000) 212A–217A.
- [5] J. Ruzicka, G.D. Marshall, *Anal. Chim. Acta* 237 (1990) 329–343.
- [6] P. Fletcher, K.N. Andrew, A.C. Calokerinos, S. Forbes, P.J. Worsfold, *Luminescence* 16 (2001) 1–23.
- [7] P. Šolich, H. Sklenářová, M. Poláček, R. Karlíček, J. Flow Injection Anal. 18 (2001) 13–19.
- [8] J. Michalowski, P. Halaburda, *Talanta* 55 (2001) 1165–1171.
- [9] A. Economou, P.D. Tzanavaras, M. Notou, D.G. Themelis, *Anal. Chim. Acta* 505 (2004) 129–133.
- [10] J. Wang, H.Z. Ye, Z. Jiang, N.S. Chen, J.L. Huang, *Anal. Chim. Acta* 508 (2004) 171–176.
- [11] Z.H. Song, S. Hou, *Anal. Chim. Acta* 488 (2003) 71–79.
- [12] J. Du, L. Shen, J. Lu, *Anal. Chim. Acta* 489 (2003) 183–189.
- [13] W. Shi, J. Yang, Y. Huang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 197–203.
- [14] N. Ratanawimarnwong, N. Amornthamarong, N. Choengchan, P. Chaisriwan, M. Amatongchai, P. Wilairat, I.D. McKelvie, D. Nacapricha, *Talanta* 65 (2005) 756–761.
- [15] N. Pizzi, M. Miro, J.M. Estela, V. Cerda, *Luminescence* 17 (2002) 205–206.
- [16] Z.H. Song, S. Hou, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28 (2002) 683–691.
- [17] Z.H. Song, N. Zhang, *Talanta* 60 (2003) 161–170.
- [18] Z.H. Song, L. Wang, *Analyst* 126 (2001) 1393–1398.
- [19] G.J. Zhou, G.F. Zhang, H.Y. Chen, *Anal. Chim. Acta* 463 (2002) 257–263.
- [20] B. Li, X. Zhang, C. Zhang, *Anal. Chim. Acta* 575 (2006) 212–216.
- [21] Z. Song, T. Zhao, L. Wang, Z. Xiao, *Bioorg. Med. Chem.* 9 (2001) 1701–1705.
- [22] J.X. Du, Y.H. Li, J.R. Lu, *Luminescence* 17 (2002) 165–167.
- [23] N. Fukutsu, T. Konse, T. Kawasaki, K. Saito, H. Nakazawa, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 599–602.
- [24] S.H. He, Y. Lu, D.Y. He, Y.F. Hu, Z.J. Zhang, *Fenxi Shiyanshi* 23 (2004) 5–7.
- [25] H.T. Wang, F.T. Dong, H.Y. Lang, *Fenxi Shiyanshi* 21 (2002) 67–69.
- [26] Z.H. Song, N. Zhang, L. Wang, *Microchim. Acta* 142 (2003) 205–211.
- [27] H.Y. Liu, L. Zhang, J.M. Zhou, Y.H. Hao, P.G. He, Y.Z. Fang, *Anal. Chim. Acta* 541 (2005) 125–129.
- [28] S.H. Wang, L.Y. Du, L.Y. Wang, H.S. Zhuang, *Anal. Sci.* 20 (2004) 315–317.
- [29] E. Nalewajko, R.B. Ramirez, A. Kojlo, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 219–223.
- [30] S.H. Wang, L.Y. Du, X.T. Wei, L.Y. Wang, H.S. Zhuang, *Spectrosc. Spect. Anal.* 25 (2005) 678–680.
- [31] Z.H. Song, X. Zhou, *Spectrochim. Acta A* 57 (2001) 2567–2574.
- [32] C.G. Xie, H. Cui, X.Q. Lin, *Fenxi Huxue* 30 (2002) 1316–1318.
- [33] J.G. Lv, Y.M. Huang, Z.J. Zhang, *Anal. Lett.* 34 (2001) 1323–1330.
- [34] Z.P. Wang, Z.J. Zhang, X. Zhang, Z.F. Fu, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (2004) 1–7.
- [35] Z.H. Song, J.H. Lu, T.Z. Zhao, *Talanta* 16 (2001) 1171–1177.
- [36] S.H. He, K.J. Tian, S.Q. Zhang, W.Y. Yu, *Fenxi Ceshi Xuebao* 24 (2005) 98–99, 103.
- [37] Y.F. Hu, Y. Lu, D.Y. He, S.H. He, Z.J. Zhang, S.H. He, *Fenxi Shiyanshi* 23 (2004) 18–20.
- [38] S.H. He, Y. Lv, D.Y. He, Y.F. Hu, Z.J. Zhang, *Fenxi Kexue Xuebao* 20 (2004) 145–147.
- [39] Z.F. Hu, H. Chen, Z.J. Zhang, *Fenxi Shiyanshi* 23 (2004) 1–4.
- [40] Y. Lv, Z.J. Zhang, D.Y. He, Y.F. Hu, *Anal. Sci.* 19 (2003) 625–627.
- [41] H. Chen, Z.J. Zhang, Z.F. Fu, *Fenxi Huxue* 30 (2002) 1344–1347.
- [42] Y.M. Huang, W.B. Liu, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38 (2005) 537–542.
- [43] J.D. Yang, *Fenxi Huxue* 30 (2002) 1529.
- [44] Z.H. Song, L. Wang, *Microchem. J.* 68 (2001) 47–52.
- [45] J.X. Du, Y.H. Li, J.R. Lu, *Anal. Lett.* 34 (2001) 1741–1748.
- [46] Z.H. Song, L. Wang, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 5697–5701.
- [47] H.J. Zhou, Z.J. Zhang, D.Y. He, Y. Xiong, *Sensors Actuators B: Chem.* 107 (2005) 798–804.
- [48] Z.H. Song, S. Hou, *Chem. Anal.* 47 (2002) 747–758.
- [49] H. Yao, Y. Tang, Y.H. Li, Y.Y. Sun, *Anal. Lett.* 36 (2003) 2975–2983.
- [50] C. Lau, X. Qin, J. Liang, J. Lu, *Anal. Chim. Acta* 514 (2004) 45–49.
- [51] Z. Song, Q. Yue, C. Wang, *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 60 (2004) 2377–2382.
- [52] H. Yao, Y.Y. Sun, X.H. Lin, J.H. Cheng, L.Y. Huang, *Luminescence* 21 (2006) 112–117.
- [53] Y. Xiong, H.J. Zhou, Z.J. Zhang, D.Y. He, C. He, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2006) 694–700.
- [54] S.C. Zhang, H. Li, *Anal. Chim. Acta* 444 (2001) 287–294.
- [55] X.L. Chen, C.X. Zhang, *Fenxi Ceshi Xuebao* 22 (2003) 50–52.
- [56] C. Wang, Z. Song, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 4127–4130.
- [57] Z.H. Song, N. Zhang, *Anal. Lett.* 36 (2003) 41–57.
- [58] Z.H. Song, S. Hou, *Talanta* 57 (2002) 59–67.
- [59] Z.H. Song, C.N. Wang, *Microchim. Acta* 149 (2005) 117–122.
- [60] J.M.R. Fernandez, J.M. Bosque-Sendra, A.M. Garcia-Campaña, F.A. Barreiro, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2005) 969–974.
- [61] J. Shi, K.L. Zhao, Q.G. Song, F.P. Cao, *Fenxi Ceshi Xuebao* 24 (2005) 77–79.
- [62] Z. Song, C. Wang, *Bioorg. Med. Chem.* 11 (2003) 5375–5380.
- [63] A. Economou, G.G. Themelis, G. Theodoridas, P.D. Tzanavaras, *Anal. Chim. Acta* 463 (2002) 249–255.
- [64] Y.X. Zhang, F.N. Chen, Y. Lu, Z.J. Zhang, *Fenxi Shiyanshi* 23 (2004) 28–30.
- [65] L. Wang, P. Yang, Y.X. Li, C.Q. Zhu, *Talanta* 70 (2006) 219–224.
- [66] Z. Song, C. Wang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 491–494.

- [67] J. Du, Y. Li, J. Lu, *Talanta* 57 (2002) 661–665.
- [68] N.B. Li, J.P. Duan, H.Q. Chen, G.N. Chen, *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi* 24 (2004) 15–17.
- [69] M.P. Bueno-Vargas, A.M. García-Campaña, J.M. Bosque Sendra, X. Zhang, *Luminescence* 17 (2002) 204–205.
- [70] A.M. García-Campaña, J.M. Bosque Sendra, M.P. Bueno-Vargas, W.R.G. Baeyens, X. Zhang, *Anal. Chim. Acta* 516 (2004) 245–249.
- [71] D. Easwaramoorthy, Y.C. Yu, H.J. Huang, *Anal. Chim. Acta* 439 (2001) 95–100.
- [72] Z.P. Wang, Z.J. Zhang, Z.F. Fu, X. Zhang, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 834–840.
- [73] E.B. Liu, B.C. Xue, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 649–653.
- [74] Z.P. Wang, Z.J. Zhang, Z.F. Fu, W.F. Luo, X. Zhang, *Talanta* 62 (2004) 611–617.
- [75] B.X. Li, D.M. Wang, C.L. Xu, Z.J. Zhang, *Microchim. Acta* 149 (2005) 205–212.
- [76] Y.Y. Sun, Y.H. Tang, X.H. Zheng, H. Yao, Z. Xu, *Anal. Lett.* 37 (2004) 2445–2458.
- [77] X.D. Shao, X.F. Xie, Y.H. Liu, Z.H. Song, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 667–670.
- [78] H.Y. Ma, *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi* 25 (2005) 1210–1212.
- [79] Z.H. Song, J.H. Lu, *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi* 21 (2001) 447–449.
- [80] X.W. Zheng, Z.H. Guo, Z.J. Zhang, *Anal. Sci.* 17 (2001) 1095–1099.
- [81] A. Safavi, M.A. Karimi, M.R. Hormozi Nezhad, *Il Farmaco* 59 (2004) 481–486.
- [82] A. Safavi, M.A. Karimi, M.R. Hormozi Nezhad, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2003) 1499–1506.
- [83] H.Y. Ma, X.W. Zheng, Z.J. Zhang, *Fenxi Ceshi Xuebao* 24 (2005) 58–60.
- [84] S.H. He, Y. Lu, D.Y. He, Y.F. Hu, Z.J. Zhang, *Fenxi Huaxue* 32 (2004) 474–476.
- [85] H.Y. Ma, X.W. Zheng, Z.J. Zhang, *Fenxi Huaxue* 32 (2004) 857–860.
- [86] Y. Lu, Z.J. Zhang, D.Y. He, Y.F. Hu, *Anal. Lett.* 36 (2003) 1587–1595.
- [87] X.L. Chen, H.Y. Ma, Y.T. Zhang, C.X. Zhang, *Lihua Jianyan Huaxue Fence* 40 (2004) 317–319.
- [88] Y.F. Zhuang, S.C. Zhang, J.S. Yu, H.X. Ju, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 281–286.
- [89] J.A. Ocaña, M. Callejón, F.J. Barragán, F.F. De la Rosa, *Anal. Chim. Acta* 482 (2003) 105–113.
- [90] F.A. Aly, N.A. Alarfaj, A.A. Alwarthan, *Talanta* 54 (2001) 715–725.
- [91] N. Lian, C.Y. Sun, H.C. Zhao, *Fenxi Kexue Xuebao* 18 (2002) 111–114.
- [92] J.A. Ocaña, F.J. Barragán, M. Callejón, F.F. De la Rosa, *Microchim. Acta* 144 (2004) 207–213.
- [93] C.Y. Sun, H.C. Zhao, L. Yi, Y. Lu, *Fenxi Huaxue* 30 (2002) 920–924.
- [94] C.Y. Sun, N. Lian, H.C. Zhao, L. Yi, L.P. Jin, *Microchim. Acta* 148 (2004) 65–70.
- [95] B.X. Li, Z.J. Zhang, L.X. Zhao, C.L. Xu, *Anal. Chim. Acta* 459 (2002) 19–24.
- [96] B.X. Li, Z.J. Zhang, L.X. Zhao, C.L. Xu, *Talanta* 57 (2004) 765–771.
- [97] N. Lian, J.C. Wang, W.H. Leng, X.J. Chang, *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi* 25 (2005) 1038–1041.
- [98] X.N. Chen, S.L. Shen, C.X. Zhang, J.R. Lu, *Fenxi Huaxue* 30 (2002) 1501–1503.
- [99] M.C. Sanfelix Alonso, L. Lahuerta Zamora, J. Martínez Calatayud, *Anal. Chim. Acta* 437 (2001) 225–231.
- [100] H.Y. Liu, J.J. Ren, Y.H. Hao, H.C. Ding, P.G. He, Y.Z. Fang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42 (2006) 384–388.
- [101] S.C. Zhang, Y.F. Zhuang, H.X. Ju, *Anal. Lett.* 37 (2004) 143–155.
- [102] L.Q. Li, Y.Y. Wu, M.L. Feng, J.R. Lu, *Fenxi Huaxue* 30 (2002) 169–171.
- [103] L. Lahuerta Zamora, Y. Fuster Mestre, M.J. Duart, G.M. Antón Fos, R. García Doménech, J. Gálvez Álvarez, J. Martínez Calatayud, *Anal. Chem.* 73 (2001) 4301–4306.
- [104] B. Gómez-Taylor Corominas, G.M. Antón Fos, J.V. García Mateo, L. Lahuerta Zamora, J. Martínez Calatayud, *Talanta* 60 (2005) 623–628.
- [105] E. Polo Merit, M. Catalá Icardo, L. Lahuerta Zamora, G.M. Antón Fos, J. Martínez Calatayud, *Anal. Chim. Acta* 527 (2004) 177–186.
- [106] M. Catalá Icardo, L. Lahuerta Zamora, G.M. Antón Fos, J. Martínez Calatayud, M.J. Duart, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 782–791.
- [107] B.J. Hindson, N.W. Barnett, *Anal. Chim. Acta* 445 (2001) 1–19.
- [108] B.J. Hindson, N.W. Barnett, P. Jones, T.A. Smith, *Anal. Chim. Acta* 451 (2002) 181–188.
- [109] A. Townshend, N. Youngvices, R.A. Wheatley, S. Liawruangrath, *Anal. Chim. Acta* 499 (2003) 223–233.
- [110] J. Huclová, D. Šatinský, H. Sklenářová, R. Karlíček, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 448–454.
- [111] M. Poláček, M. Jambor, *Talanta* 58 (2002) 1253–1261.
- [112] B. Gómez-Taylor Corominas, M. Catalá Icardo, L. Lahuerta Zamora, J.V. García Mateo, J. Martínez Calatayud, *Talanta* 64 (2004) 618–625.
- [113] M.C. Sanfelix Alonso, L. Lahuerta Zamora, J. Martínez Calatayud, *Talanta* 60 (2003) 369–376.
- [114] J.X. Du, Y.H. Li, J.R. Lu, *Anal. Lett.* 35 (2002) 2295–2304.
- [115] Y.H. Li, A.H. Zhang, J.X. Du, J.U. Lu, *Anal. Lett.* 36 (2003) 871–879.
- [116] B. Gómez-Taylor Corominas, J.V. García Mateo, L. Lahuerta Zamora, J. Martínez Calatayud, *Talanta* 58 (2002) 1243–1251.
- [117] J.X. Du, Y.H. Li, Y. Tang, J.R. Lu, *Anal. Lett.* 35 (2002) 463–472.
- [118] H. Pásková, M. Poláček, J.F. Cigarro, J. Dolejšová, *Anal. Chim. Acta* 438 (2001) 165–173.
- [119] Y.H. He, F. Nie, J.R. Lu, *Fenxi Huaxue* 29 (2001) 296–298.
- [120] S.L. Fan, Z.H. Wu, L. Zhang, C. Lu, J.M. Lin, *Fenxi Ceshi Xuebao* 22 (2003) 87–89.
- [121] S.L. Fan, Z.H. Wu, L. Zhang, C. Lu, *Anal. Lett.* 35 (2002) 1479–1489.
- [122] S.L. Fan, L. Zhang, Z.H. Wu, J.M. Lin, *Fenxi Shiyanshi* 22 (2003) 48–50.
- [123] J. Pan, Y.M. Huang, *Anal. Lett.* 37 (2004) 2321–2335.
- [124] C.G. Xie, H.F. Li, *Fenxi Shiyanshi* 23 (2004) 61–62.
- [125] Z.P. Wang, Z.J. Zhang, Z.F. Fu, D.L. Chen, X. Zhang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 765–773.
- [126] Y.Y. Sun, Y.H. Tang, H. Yao, X.H. Zheng, *Talanta* 64 (2004) 156–159.
- [127] M. Catalá Icardo, M. Misiewicz, A. Ciucu, J.V. García Mateo, J. Martínez Calatayud, *Talanta* 60 (2003) 405–414.
- [128] M. Catalá Icardo, J.V. García Mateo, M. Fernández Lozano, J. Martínez Calatayud, *Anal. Chim. Acta* 499 (2003) 57–69.
- [129] B. Gómez-Taylor, M. Palomeque, J.V. García Mateo, J. Martínez Calatayud, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 347–357.
- [130] K.L. Zhao, J. Shi, Q.G. Song, *Fenxi Shiyanshi* 24 (2005) 12–14.
- [131] Z.M. Huang, Z.J. Zhang, *Anal. Lett.* 36 (2003) 2783–2792.
- [132] N. Anastos, N.W. Barnett, B.J. Hindson, C.E. Leavelle, S.W. Lewis, *Talanta* 64 (2004) 130–134.
- [133] M. Liu, J.R. Lu, Y.H. He, J.X. Du, *Anal. Chim. Acta* 541 (2005) 99–104.
- [134] C. Thongpoon, B. Liawruangrath, S. Liawruangrath, R.A. Wheatley, A. Townshend, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42 (2006) 277–282.
- [135] S.L. Liao, X.P. Wu, Z.H. Xie, *Anal. Chim. Acta* 537 (2005) 189–195.
- [136] P. Qu, B.X. Li, Z.J. Zhang, *Fenxi Huaxue* 32 (2004) 665–667.
- [137] Y.Y. Sun, Y.H. Tang, H. Yao, Y.H. Li, *Anal. Sci.* 21 (2005) 457–460.
- [138] Y. Fuster Mestre, M. Fernández Lozano, J. Martínez Calatayud, *J. AOAC Int.* 84 (2001) 13–18.
- [139] S.M. Sultan, Y.A.M. Hassan, A.M. Abulkibash, *Talanta* 59 (2003) 1073–1080.
- [140] A. Townshend, J.A. Murillo Pulgarín, M.T. Alañón Pardo, *Anal. Chim. Acta* 488 (2003) 81–88.
- [141] W.X. Liu, J.X. Du, J.R. Lu, *Fenxi Shiyanshi* 23 (2004) 41–43.
- [142] Y.H. He, J.R. Lu, M. Liu, J.X. Du, *Analyst* 130 (2005) 1032–1037.
- [143] R.D. Gerardi, N.W. Barnett, S.W. Lewis, *Anal. Chim. Acta* 378 (1999) 1–41.
- [144] T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, J. Martín, *Talanta* 58 (2002) 987–994.
- [145] I.N. Tomita, L.O.S. Bulhões, *Anal. Chim. Acta* 442 (2001) 201–206.
- [146] T. Pérez Ruiz, C. Martínez Lozano, J. Martín, E. Ruiz, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42 (2006) 143–147.
- [147] C. Thongpoon, B. Liawruangrath, S. Liawruangrath, A. Wheatley, A. Townshend, *Anal. Chim. Acta* 553 (2005) 123–133.
- [148] N.A. Alarfaj, S.A.A. El-Razeq, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1423–1427.
- [149] N.A.A. Alarfaj, *Anal. Sci.* 19 (2003) 1145–1149.
- [150] F.A. Aly, S.A. Al-Tamimi, A.A. Alwarthan, *Talanta* 53 (2001) 885–893.
- [151] N.A. Al-Arfaj, *Talanta* 62 (2004) 255–263.
- [152] S.L. Wei, L.X. Zhao, X.L. Cheng, J.M. Lin, *Anal. Chim. Acta* 545 (2005) 65–73.

- [153] W. Ruengsitagoon, S. Liawruangrath, A. Townshend, *Talanta* 69 (2006) 976–983.
- [154] B.A. Gorman, N.W. Barnett, R. Bos, *Anal. Chim. Acta* 541 (2005) 119–124.
- [155] A. Townshend, W. Ruengsitagoon, C. Thongpoon, S. Liawruangrath, *Anal. Chim. Acta* 541 (2005) 105–111.
- [156] F.A. Aly, S.A. Al-Tamimi, A.A. Alwarthan, *Anal. Sci.* 17 (2001) 1257–1262.
- [157] A. Waseent, M. Yaqoob, A. Nabi, *Anal. Sci.* 22 (2006) 1095–1098.
- [158] X.W. Zheng, Y. Mei, Z.J. Zhang, *Anal. Chim. Acta* 440 (2001) 143–149.
- [159] H.B. Yang, C.X. Zhang, *Fenxi Shiyanshi* 20 (2001) 43–46.
- [160] X.W. Zheng, Z.J. Zhang, B.X. Li, *Electroanalysis* 13 (2001) 1046–1050.
- [161] B.X. Li, Z.J. Zhang, M.L. Wu, *Microchem. J.* 70 (2001) 85–91.
- [162] M.L. Wu, B.X. Li, Z.J. Zhang, *Fenxi Huaxue* 29 (2001) 267–270.
- [163] B.X. Li, Z.J. Zhang, W. Liu, *Talanta* 55 (2001) 1097–1102.
- [164] X.L. Chen, H.Y. Ma, Y.T. Zhang, Y.F. Wang, *Fenxi Shiyanshi* 24 (2005) 10–12.
- [165] X.F. Yang, H. Li, *Talanta* 64 (2004) 478–483.
- [166] S.L. Fan, L. Wei, X.F. Wang, *Lihua Jiangan Huaxue Fence* 40 (2004) 315–316.
- [167] Z.J. Gong, Y.M. Huang, Z.J. Zhang, *Fenxi Huaxue* 32 (2004) 641–643.
- [168] Z.H. Song, L. Wang, *Phytochem. Anal.* 14 (2003) 216–220.
- [169] Y.M. Huang, Z.J. Zhang, *Anal. Lett.* 34 (2001) 1703–1710.
- [170] Y.T. Zhang, W.P. Yang, Z.J. Zhang, S.K. Tian, *Fenxi Shiyanshi* 22 (2003) 33–35.
- [171] B.X. Li, W. Liu, Z.J. Zhang, *Fenxi Huaxue* 29 (2001) 428–430.
- [172] Y. Lv, Z.J. Zhang, Y.F. Hu, D.Y. He, S.H. He, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 555–561.
- [173] S.L. Fan, C. Lu, J. Wang, Q.X. Zhou, *Fenxi Shiyanshi* 20 (2001) 61–63.
- [174] S.L. Fan, C. Lu, Q.X. Zhou, J. Wang, *Fenxi Huaxue* 29 (2001) 367.
- [175] Y.M. Huang, Z.H. Chen, *Talanta* 57 (2002) 953–959.
- [176] L.H. Nie, H.C. Zhao, X. Wang, *Fenxi Huaxue* 29 (2001) 910–912.
- [177] J.J. Li, J. Zhou, X. Zhang, J. Shi, L.B. Qu, *Fenxi Kexue Xuebao* 21 (2005) 295–297.
- [178] X.N. Han, Y.H. Tang, C.L. Yu, X.H. Zheng, Q.J. Jin, *Anal. Lett.* 38 (2005) 1933–1941.
- [179] Q. Zhang, A. Myint, L. Liu, X. Ge, H. Cui, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 587–592.
- [180] W.B. Liu, Y.M. Huang, *Anal. Chim. Acta* 506 (2004) 183–187.
- [181] M. Ciborowski, M. Catalá Icardo, J.V. García Mateo, J. Martínez Calatayud, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 693–700.
- [182] J. Michalowski, A. Kojlo, O.A. Estrela, *Chem. Anal.* 47 (2002) 267–274.
- [183] J. Michalowski, A. Kojlo, *Talanta* 54 (2001) 107–113.
- [184] H.Y. Liu, L. Zhang, Y.H. Hao, O.J. Wang, P.G. He, Y.Z. Fang, *Anal. Chim. Acta* 541 (2005) 187–192.
- [185] Z.P. Wang, Z.J. Zhang, Z.F. Fu, W.F. Luo, X. Zhang, *Anal. Lett.* 36 (2003) 2683–2697.
- [186] L.Q. Fang, *Fenxi Huaxue* 33 (2005) 66–68.
- [187] Z.P. Wang, Z.J. Zhang, Z.F. Fu, L.Q. Fang, L.X. Zhang, *Anal. Sci.* 20 (2004) 319–323.
- [188] L.Q. Fang, X.Y. Li, J.D. Yang, *Fenxi Ceshi Xuebao* 23 (2004) 20–22, 26.
- [189] L.X. Zhao, B.X. Li, Z.J. Zhang, J.M. Liu, *Sens. Actuators B* 97 (2004) 266–271.
- [190] X.H. Zhu, Y.H. He, M. Liu, J.X. Du, J.R. Lu, *Fenxi Huaxue* 32 (2004) 752–754.
- [191] S.Q. Han, E.B. Liu, H. Li, *Microchim. Acta* 149 (2005) 281–286.
- [192] F. Nie, J.R. Lu, W.F. Niu, *Anal. Chim. Acta* 545 (2005) 129–136.
- [193] B.X. Li, Z.J. Zhang, W. Liu, *Talanta* 54 (2001) 697–702.
- [194] Y.D. Liang, J.F. Song, X.F. Yang, *Anal. Chim. Acta* 510 (2004) 21–28.
- [195] L. Gámiz Gracia, A.M. García-Campaña, F. Akés Barrero, L. Cuadros Rodríguez, M. Schiavone, W.R.G. Baeyens, *Luminescence* 17 (2002) 201–203.
- [196] F.Z. Yang, C. Zhang, W.R.G. Baeyens, X.R. Zhang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 473–478.
- [197] L.Q. Li, Y.M. Zhou, M.L. Feng, J.R. Lu, *Fenxi Shiyanshi* 20 (2001) 28–30.
- [198] Z.F. Yang, C. Zhang, J.N. Wang, X.R. Zhang, *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi* 24 (2004) 145–148.
- [199] F. Nie, Y.C. Wu, J.R. Lu, *Fenxi Huaxue* 31 (2003) 512.
- [200] B. Liu, J.Z. Wang, Y. Man, *Fenxi Ceshi Xuebao* 22 (2003) 45–47.
- [201] J.M. Fernández-Ramos, A.M. García-Campaña, F. Akés Barrero, J.M. Bosque-Sendra, *Talanta* 69 (2006) 763–768.
- [202] F. Nie, H.J. Liu, X.M. Zhu, *Fenxi Kexue Xuebao* 21 (2005) 527–529.
- [203] J.Z. Wang, B. Liu, Y.M. Zhou, *Fenxi Kexue Xuebao* 21 (2005) 63–65.
- [204] M.L. Yang, L.Q. Li, J.R. Lu, Z.J. Zhang, *Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi* 33 (2002) 85–87.
- [205] J.Z. Wang, B. Liu, Y.M. Zhou, *Fenxi Ceshi Xuebao* 25 (2005) 110–112.
- [206] G.Z. Tsogas, D.V. Stergiou, A.G. Vlessidis, N.P. Evmiridis, *Anal. Chim. Acta* 541 (2005) 151–157.
- [207] Q.H. Wei, H.S. Zhuang, Q.E. Wang, G.N. Chen, *Fenxi Kexue Xuebao* 17 (2001) 501–504.
- [208] X. Wang, H.C. Zhao, L.H. Nie, L.P. Jin, Z.L. Zhang, *Anal. Chim. Acta* 445 (2001) 169–175.
- [209] L.Q. Fang, Z.P. Wang, Z.F. Fu, W.F. Luo, Z.J. Zhang, *Fenxi Ceshi Xuebao* 22 (2003) 25–28.
- [210] M.L. Yang, L.Q. Li, J.R. Lu, Z.J. Zhang, *Fenxi Huaxue* 29 (2001) 410–412.
- [211] Y.D. Liang, J.F. Song, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38 (2005) 100–106.

5.2 ***Příloha 2: K. Mervartová, M. Catalá Icardo, J. Martínez Calatayud, A fully automated assembly using solenoid valves for the photodegradation and chemiluminometric determination of the herbicide Chlorsulfuron, Anal. Lett. 38 (2005) 179 – 194***

Analytical Letters, 38: 179–194, 2005
Copyright © Taylor & Francis, Inc.
ISSN 0003-2719 print/1532-236X online
DOI: 10.1081/AL-200043477



ENVIRONMENTAL ANALYSIS

A Fully Automated Assembly Using Solenoid Valves for the Photodegradation and Chemiluminometric Determination of the Herbicide Chlorsulfuron

K. Mervartová and J. Martínez Calatayud

Department of Analytical Chemistry, University of Valencia,
Valencia, Spain

M. Catalá Icardo

Department of Chemistry, Polytechnic University of Valencia,
Valencia, Spain

Abstract: This paper presents a new photochemiluminescent system for the determination of chlorsulfuron in water samples. The light from a low-pressure mercury lamp is used as a clean, reproducible, and inexpensive "reagent" for the derivation of the pesticide, performed in glycine buffer at pH 9.5. Then, the photo-products from irradiation are oxidized by permanganate in sulfuric acid solution. The oxidation reaction was favored by using high temperatures. A comparative study and discussion about the use of polyphosphoric acid instead of sulfuric acid in the oxidation reaction is also presented.

The use of solenoid valves allows for the easy, complete automation of the process with low sample and reagent consumption. The calibration graph was linear over the range 0.1–1.3 mg L⁻¹ of chlorsulfuron, the limit of detection was 0.06 mg L⁻¹, and the throughput was 25 h⁻¹. The proposed method was applied to the determination of the pesticide in spiked mineral water samples.

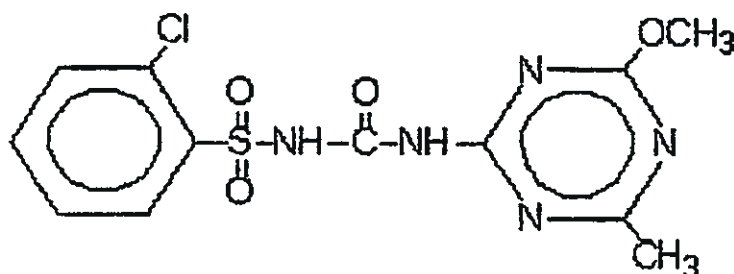
Keywords: Chlorsulfuron, photochemiluminescence, pesticides, solenoid valves

Received 8 June 2004; accepted 30 September 2004

Address correspondence to J. Martínez Calatayud, Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, Valencia, Spain. E-mail: jose.martinez@uv.es

INTRODUCTION

Chlorsulfuron (CLS), 2-chloro-*N*-[4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl]-amino-carbonyl]benzenesulfonamide (see structural formula), is a herbicide of the sulfonamide family. The significance of this compound family lies in the following two facts: (a) a high toxicity, which allows the use of relatively low application rates; and (b) a short lifetime in soil [e.g., 2–8 weeks for CLS (Brown, 1990), the principal degradation mechanism for which, particularly in acid soils, is hydrolysis].



Most reported methods for the determination of CLS involve its chromatographic or electrophoretic separation, in addition to its previous extraction (usually by SPE). Specially prominent among the most recent determinations are those in drinking water by HPLC-SPE (Zhu et al. 2002); river water by GC-MS (Ludvigsen and Lode 2002); environmental materials (Voyskner and Townsend 2002) and rainwater (Bossi et al. 2002) by SPE-LC-MS; water samples by GC-SPE (Berrada, Molto, and Font 2001); and soils by supercritical fluid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (Dost et al. 2000) and capillary electrophoresis (Menzinger et al. 2000). However sensitive and precise, these methods require the use of sophisticated, expensive equipment, which makes advisable the development of more affordable alternatives.

Immunoanalytical techniques, which are based on the antigen–antibody interaction, are both specific and sensitive; although they are readily implemented, they can also be very expensive. The specific techniques used in this context include fluorescence polarization immunoassay (Eremin et al. 2002) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Chigrin et al. 1989; Kelley et al. 1985).

Some authors have also used differential pulse polarography to determine sulfonamides, CLS included (Concialini, Lippolis, and Galletti 1989).

Coly and Aaron explored the irradiation of CLS with UV light for analytical purposes. By using an appropriate photoreaction medium, strongly fluorescing derivatives can be obtained. The first derivative of the UV fluorescent spectrum has been used to resolve binary mixtures of CLS with sulfomethuron-methyl (Coly and Aaron 2001) and metsulfuron-methyl (Coly and Aaron 2000), using the zero-crossing method. This pesticide has also been determined in a direct

Chlorsulfuron—Photodegradation and Chemiluminometric Determination 181

manner in a micellar medium, both batchwise (Coly and Aaron 1999a) and by flow injection analysis (Coly and Aaron 1999b). The application range for the latter two methods is $1\text{--}720\ \mu\text{g L}^{-1}$ (LOD $0.5\ \mu\text{g L}^{-1}$) and $3\text{--}252\ \mu\text{g L}^{-1}$ (LOD $0.2\ \mu\text{g L}^{-1}$), respectively.

The UV irradiation products of CLS have been studied by several authors. Interest in this topic has been aroused by the fact that light constitutes a straightforward, clean, economic, reproducible means for the in situ control of various pollutants (Caselli, Ponterini, and Vignali 2001; Maurino et al. 1999).

To the authors' knowledge, this is the first chemiluminescence-based determination of CLS to be reported and also the first using "multicommutation" continuous-flow methodology for its automated quantitation.

EXPERIMENTAL**Reagents and Apparatus**

All reagents used were analytically pure, unless stated otherwise, and prepared in water purified by reverse osmosis and then deionized ($18\ \text{M}\Omega\text{-cm}$) with a Sybron/Barnstead Nanopure II (Jefferson City, Missouri, U.S.A.) water purification system provided with a fiber filter of $0.2\ \mu\text{m}$ pore size. The chlor-sulfuron was from two commercially available solid formulations, from Dr Ehrenstorfer (98.5% purity, Augsburg, Germany) and Riedel-de Haën (99.8% purity, Seelze, Germany). Other reagents used were: KMnO_4 , H_2SO_4 , $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, NaCl , $\text{FeNO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, Triton X-100, dimethylformamide and $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ from Panreac (Barcelona, Spain); Polyphosphoric acid from Riedel-de Haën (Madrid, Spain); $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$, NH_3 , Na_2HPO_4 , NH_4Cl , $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ and sodium acetate from Probus (Barcelona, Spain); H_2O_2 , ethanol and acetonitrile from Merck (Madrid, Spain); KH_2PO_4 , NaOH , HCl and acetic acid from J. T. Baker (Paris, France); sodium dodecyl sulphate and hexadecylpyridinium chloride from Fluka (Madrid, Spain); glycine and acetone from Guinama (Valencia, Spain). Exchange resins: Amberlite 200, strongly acidic, size 16–50, from Sigma (Madrid, Spain); Duolite C20, strong cationic, and Duolite A-102D, strong anionic, from Probus (Barcelona, Spain).

The flow manifold depicted in Fig. 1, consisted of a PTFE coil of 0.8 mm i.d.; a Gilson (Worthington, OH, USA) Minipuls 2 peristaltic pump provided with pump tubing from Omnifit; and, three solenoid valves Model 161T031 (Nresearch, Northboro, MA, USA). The photoreactor consisted of a 173 cm length and 0.8 mm i.d. PTFE tubing helically coiled around a 15 W low-pressure mercury lamp (Sylvania) for germicidal use. The flow cell was a flat-spiral quartz tube of 1 mm i.d. and 3 cm total diameter backed by a mirror for maximum light collection. The photodetector work-package was

182

K. Mervartová, J. M. Calatayud, and M. C. Icardo

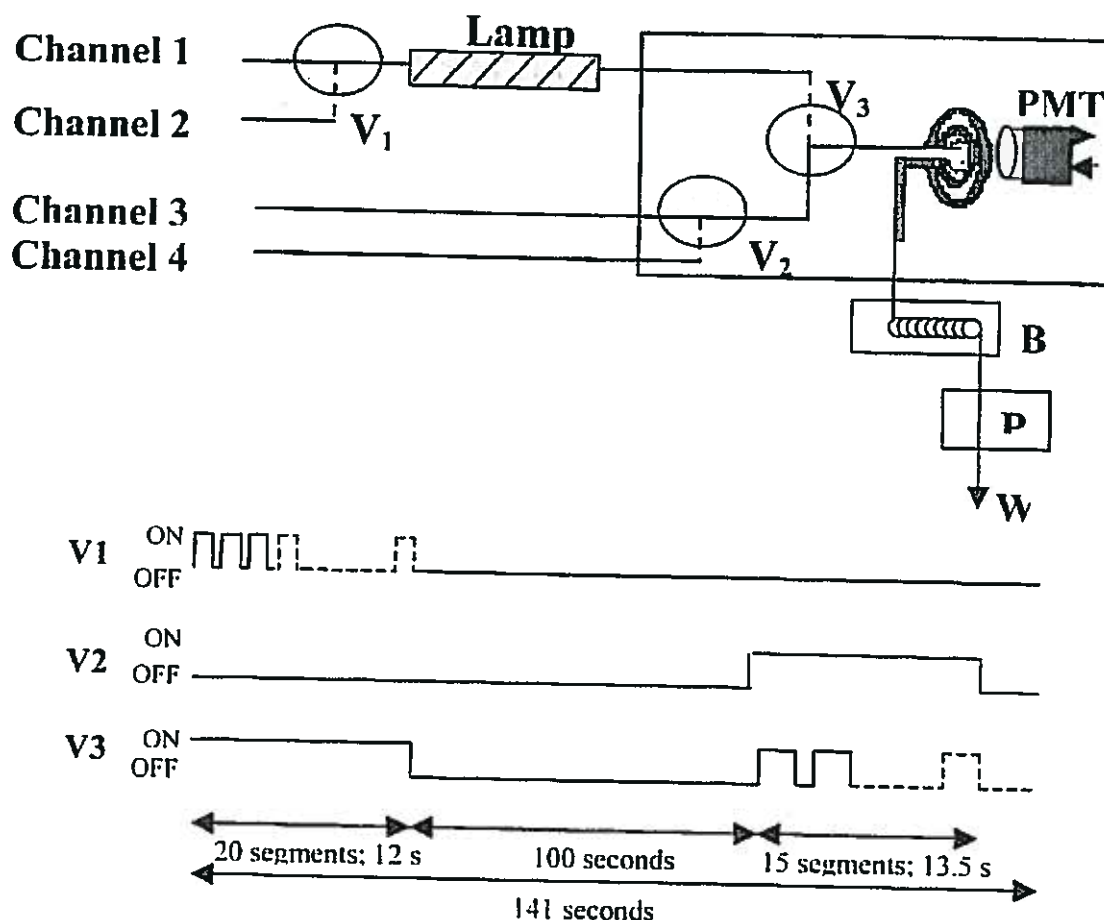


Figure 1. Flow assembly optimized (top). Channel 1: photodegradation medium (glycine buffer at pH 9.5); Channel 2: aqueous solution of chlorsulfuron; Channel 3: carrier (water) at 80°C; Channel 4: oxidant (KMnO_4 $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ in H_2SO_4 1.8 mol L^{-1}). Flow rate: 10 mL min^{-1} . P: peristaltic pump; W: Waste; B: ice water bath; PMT: photomultiplier tube; V: solenoid valve; Lamp: a 15 W low-pressure mercury lamp (Sylvania) for germicidal use. The photoreactor consisted of a 173 cm length and 0.8 mm i.d. PTFE tubing helically coiled around the lamp. The solid line in the solenoid valve represents the pathway of the flow in OFF position, and the broken line corresponds to the ON position. Bottom, optimized insertion profile to obtain the analytical outputs.

a P30CWAD5F-29 Type 9125 photomultiplier tube (PMT) supplied by Electron Tubes operating at 1280 V; it was located in a laboratory-made light-tight box. The output was fed to a computer equipped with a counter-timer, also supplied by Electron Tubes.

Chlorsulfuron—Photodegradation and Chemiluminometric Determination 183

as an independent commutator ON/OFF (Catalá-Icardo, García-Mateo, and Martínez-Calatayud 2002; García Mateo, N.D.; Rocha et al. 2002) and the complete cycle can be described in terms of $N^*(t_1, t_2)$, where t_1 is the time interval in ON position, t_2 corresponds to the OFF mode; and N is the number of the repeated ON/OFF sequences. The system configuration was the same during the whole empirical work; only the ratio t_1/t_2 and N were varied. The pump is placed after the detector, being sample and reagent solutions aspirated to the flow-cell at flow rate 10 mL min^{-1} (the flow rate was measured for the pure water carrier stream). The position of the peristaltic pump in the multicommutation manifolds different to the parent methodology (FIA), is obliged to avoid overpressures when a valve is in the OFF position and avoiding the flow of the solution. The alternative when the "usual" pump position in the flow assembly is preferred, requires use of a higher number of solenoid valves. A cold water bath was nesting in the way detector-peristaltic pump to prevent noncontrolled changes in the flow rate due to the effect of high temperature on the pump tubing when a high-temperature water bath is required for the chemical system.

The insertion profile in the finally proposed flow manifold was as follows: (a) valve V1 segmented the analyte solution with glycine buffer at pH 9.5 (proposed as the suitable photodegradation medium) leading these segments to the photoreactor. During each microinsertion, V1 was ON 0.5 s (aspiration of chlorsulfuron) and, deactivated during 0.1 s (valve OFF, aspiration of the buffer). During the required interval (N 20 or 12 s) for the process, valve V3 was ON, allowing the peristaltic pump to aspirate chlorsulfuron and medium. This time interval also allowed cleaning of the internal walls of the photoreactor to avoid sample cross contamination. Next 100 s period, the UV-photodegradation stopped flow interval, all valves were in the OFF mode. Then valve V2 was activated to allow the stream of the oxidant solution, which was divided in microsegments in V3 and alternated with microinsertions of the resulting photofragments of chlorsulfuron: 15 (0.7, 0.2). This generated the chemiluminescent emission in the flow cell; and, when baseline was reached again (circulating pure water), a new cycle started; total time 141 s.

Preparation of Solutions**Preparation of Samples**

Mineral water samples from different origins were spiked with chlorsulfuron standard solution of 10 mg L^{-1} to obtain five solutions containing chlorsulfuron into the dynamic range of application ($0.1\text{--}1.3 \text{ mg L}^{-1}$). The added amount found was compared with the amount to determine evidence of constants or proportional systematic errors.

Preparation of Stock Solutions

Stock solutions of chlorsulfuron (10 or 20 mg L^{-1}) were prepared by weighing and dissolving the exact required amount of pesticide; then it was dissolved in pure water with the help of an ultrasonic bath and magnetic stirring. The resulting solution was stable for 3 days in the refrigerator and protected against light. The working standard solutions were freshly prepared by diluting the stock solution in the appropriate volume of water. All freshly prepared solutions of pesticides were also protected against room light.

RESULTS AND DISCUSSION

The proposed assembly consists of two distinct parts in terms of chemical and flow-related variables, namely: (I) the CLS photoreaction manifold and (II) the derivatization manifold, where a strong oxidant is used to generate the chemiluminescence. The operation of the two parts was optimized separately.

Influence of the Reaction Medium on the Photodegradation of Chlorsulfuron

The photodegradation of chlorsulfuron was previously studied by some authors (Coly and Aaron 1999a, b, 2000, 2001; Caselli et al. 2001; Maurino et al. 1999); to the authors' knowledge, however, neither the substrate nor its reaction products have to date been determined using a chemiluminescent reaction.

Based on our previous experience (Catalá Icardo et al. 2003a, b; Segarra et al. 2003), we chose sulfuric potassium permanganate for the preliminary photodegradation assays, among the strong oxidants recommended in the literature as the most suitable for generating the chemiluminescent response.

Figure 2(a) shows the chemiluminescence emission intensities obtained by irradiating a 20 mg L^{-1} solution of chlorsulfuron in various media including buffers at pH 3–10.5; Fe(II) ($10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) and H_2O_2 (0.05%) (both of which are used in the photo-Fenton reaction (Bauer and Fallmann 1997; Huston and Pignatello 1999); and Fe(III) ($10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), which is an efficient photocatalyst (Catastini et al. 2002). As can be seen from the figure, only the glycine buffer (pH 8.6) resulted in a significantly increased analytical signal relative to the pure water as medium. Further tests with the buffer at a variable pH from 8.6 to 10.5 [Fig. 2(b)] provided a plateau between pH 9.2 and 9.9 in the response, so pH 9.5 was adopted as optimal.

Chlorsulfuron—Photodegradation and Chemiluminometric Determination 185

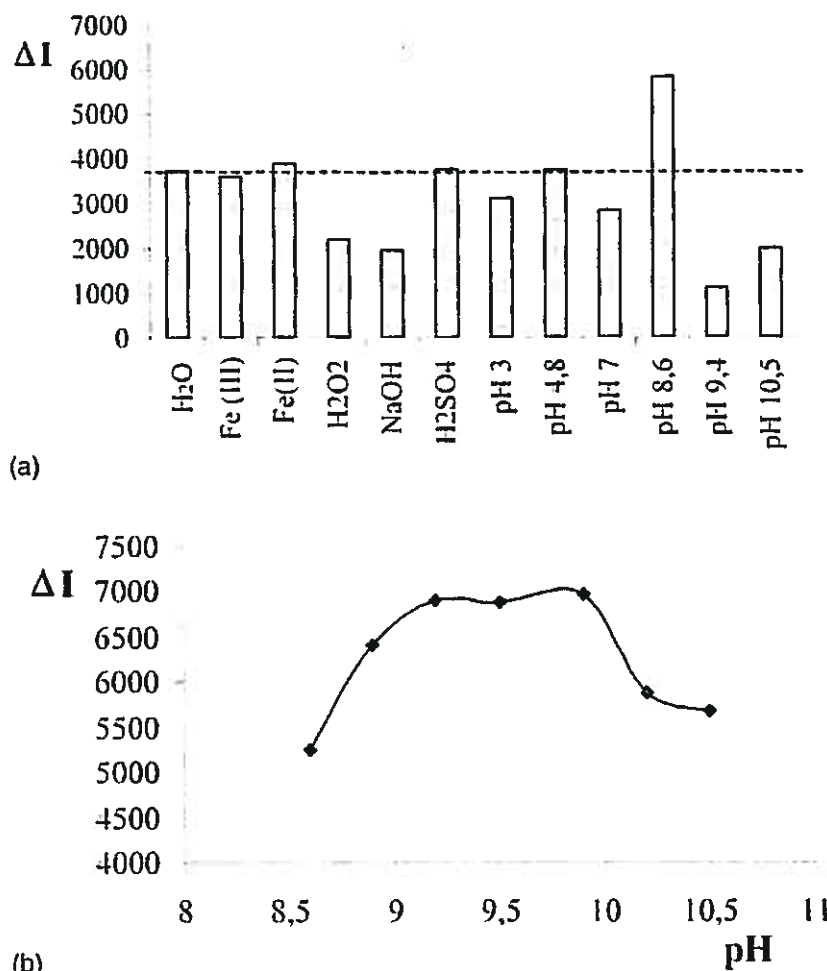


Figure 2. Effect of the medium on the chlorsulfuron photoreaction. (a) (top): All tested media. Broken line corresponds to the pure water signal. The used buffers for the different pH tested values were as follows (pH, buffer): 3, glycine and HCl; 4.8, acetic-acid and sodium acetate; 7.0, H_2PO_4^- and HPO_4^{2-} ; 8.6, glycine and NaOH; 9.4, NH_3 and NH_4^+ ; and, 10.5, sodium tetraborate and NaOH. (b) (bottom): Different pH solutions prepared with the buffer glycine and NaOH.

Optimization of the Oxidant

The suitable oxidant (chlorsulfuron in 20 mg L^{-1} concentration) was established by testing: permanganate and Ce(IV) (both in a sulfuric acid medium), and hexacyanoferrate(III) and *N*-bromosuccinimide (both in an NaOH medium). The choice was permanganate on account of it provided the strongest signal, 30% greater than that provided by ferricyanide, and also bearing in mind it has been found to provide greater sensitivity, selectivity, and reproducibility than ferricyanide (Chivulescu et al. 2004).

Based on the analytical literature, usually sulfuric acid is the medium of choice for using potassium permanganate as oxidant in direct

chemiluminescence-based methods. However, polyphosphoric acid is known to promote the emission of permanganate, as shown in the determinations of different pharmaceuticals (Abbott, Townshend, and Gill 1986; Amiott and Andrews 1997; Christie et al. 1995; Alwarthan and Townshend 1986; Deftereos, Grekas, and Calokerinos 2000; Mitsana-Papazoglou et al. 2000).

After a series of empirical assays, and under identical conditions, the use of 3, 5, or 7% polyphosphoric acid with a chlorsulfuron concentration of 20 mg L^{-1} was found to provide a chemiluminescent signal up to 9.2 times stronger than that obtained with 2.0 mol L^{-1} sulfuric acid. However, polyphosphoric acid also provided high blank signals and lower reproducibility. Other empirical approaches provided poor results; although the slope was much greater with polyphosphoric acid, the responses obtained at low pesticide concentrations were quite similar. Because our primary interest was to determine small amounts of analyte, we chose to use both media (sulfuric and polyphosphoric acid) in parallel in order to identify that yielding the best results.

Optimization of the Oxidant Concentration and Oxidation Medium

Figure 3 illustrates the effect of the polyphosphoric and sulfuric acid concentrations. With polyphosphoric acid, the response peaked at a concentration of 0.5–1%; however, the blank signal increased with decreasing polyphosphoric concentration. In order to avoid an adverse effect on the limit of detection, we chose a 2% polyphosphoric acid concentration for subsequent work. On the other hand, the analytical signal increased with increasing sulfuric acid concentration throughout the studied range. A concentration of 2.0 mol L^{-1} was selected in order to avoid using too concentrated solutions and, hence, causing potential deterioration of the manifold.

The response to the concentration of permanganate was identical with both media (5 mg L^{-1} of chlorsulfuron), and a permanganate concentration of $6 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ was adopted.

Effect of Sensitizers and Surfactants

The chemiluminescence emission of analytical systems based on the direct oxidation of the analyte can be enhanced by using a sensitizer or a micellar medium (Catalá Icardo et al. 2003a). We studied the following substances in this work: 25% ethanol, 5% dimethylformamide, 0.5% formic acid, 25% 2-propanol, 25% acetonitrile, 0.5% acetone, 1.2% and 0.2% sodium dodecylsulfate (SDS), 0.06% Triton X-100, 1.2% β -cyclodextrin, and $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ quinine sulfate. Hexadecylpyridinium chloride (0.2%), benzalkonium chloride (0.6%) and *N*-cetyl-*N,N,N*-trimethylammonium chloride (0.2%) were only tested with SA, as it had previously been found to form a precipitate

Chlorsulfuron—Photodegradation and Chemiluminometric Determination 187

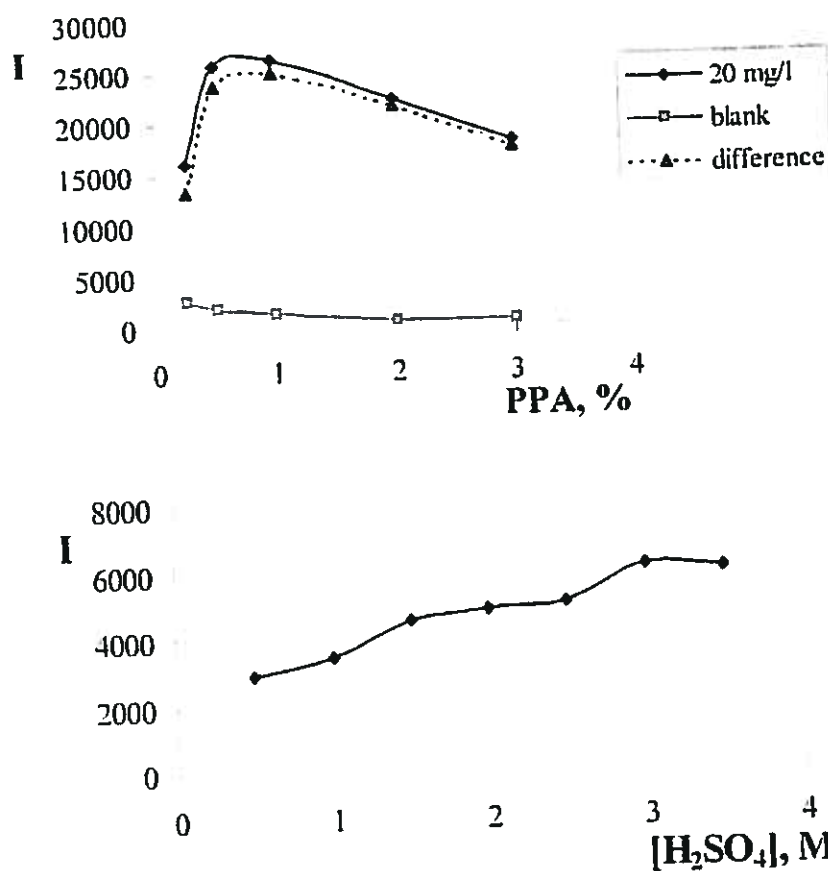


Figure 3. Effect of the concentration of polyphosphoric acid (APP) and sulfuric acid (AS) used as medium for the oxidation with permanganate.

with PPA under similar batch conditions. All substances used in these tests were prepared in glycine buffer at pH 9.5. Only small increases were observed, except for ethanol, which increased both the analytical signal and the blank signal; due to that, the use of any tested substance was discarded. Similar results were also observed with sulfuric acid, by the presence of β -cyclodextrin or quinine sulfate.

Influence of the Photodegradation Time

The effect of UV light exposure times from 30 to 240 s was examined with the flow stopped. A 5 mg L^{-1} solution of chlorsulfuron and glycine buffer at pH 9.5 as photodegradation medium were used for this purpose. The signal was found to increase linearly with increasing exposure time from 30 to 90 s and then level off. An irradiation time of 100 s was chosen in order to ensure an adequate insertion rate.

Combined Influence of Temperature and Flow Rate

Temperature can have a relatively complex effect on chemiluminescent systems (García-Mateo, N.D.). In principle, a temperature rise can decrease the emission intensity through an increased probability of deactivation via external conversions. However, chemiluminescent reaction can be affected by temperature in both thermodynamic and kinetic terms. If the temperature increase affects the reaction kinetics—by accelerating the chemiluminescent process—then the optimum flow rate will also be affected by the temperature change. For this reason, the two variables were optimized jointly. The temperatures studied were room level (20°C), 40, 60, and 80°C, and the flow rates examined were 8, 10, and 11 mL min⁻¹. Of the 12 possible combinations, a temperature of 80°C in conjunction with a flow rate of 10 mL min⁻¹ was found to provide the best results with both sulfuric and polyphosphoric acid. The use of higher temperatures was avoided in order to prevent bubbling in the system.

Optimization of the Insertion Sequence

The optimization of the insertion profile allows one to obtain the $N^*(t_1, t_2)$ combination for each solenoid valve that will ensure optimal computer-controlled mixing of the sample and reagents. The optimization sequence was as follows: initially, t_1 (viz. the size of the chlorsulfuron segment) was varied on constancy of t_2 ; then, t_2 (the size of the glycine buffer) was changed at a constant t_1 value; finally, the size of both segments was changed simultaneously while keeping the t_1/t_2 ratio constant. N (number of ON/OFF cycles) was kept at a constant, large enough value in all cases in order to ensure that the volumes of sample and medium sufficed to fill up the photoreactor zone and provide a small excess to flush the reactor walls and avoid sample carryover—or, when inserting the irradiated sample and the oxidant, to ensure thorough mixing of the sample while avoiding wasting reagents. The aspiration sequence for the sample and photoreaction medium selected in terms of sensitivity and selectivity was $20^*(0.5, 0.1)$, i.e., aspiration of the sample for 0.5 s and of the photodegradation medium for 0.1 s, the sequence being repeated 20 times.

The selected photodegraded sample oxidant insertion sequence (i.e., the switching sequence) differed for each acid used as oxidation medium. Thus, the optimum sequence with polyphosphoric acid was $15^*(0.6, 0.2)$ (i.e., aspiration of the irradiated pesticide for 0.6 s and then of the oxidant for 0.2 s, the sequence being repeated 15 times); with sulfuric acid, the optimum sequence was $15^*(0.7, 0.2)$ (i.e., aspiration of the irradiated pesticide for 0.7 s, followed by aspiration of the oxidant for 0.2 s, the process being repeated 15 times).

Chlorsulfuron—Photodegradation and Chemiluminometric Determination 189**Reoptimization of Chemical Variables**

The increased working temperature used and the successive optimization tests resulted in substantial blank signals, especially with polyphosphoric acid. New tests involving different low concentrations of pesticide and polyphosphoric acid were conducted; although the slope of the curve increased with increasing polyphosphoric acid concentration and the chemiluminescence signal was found to be inhibited at low chlorsulfuron levels. However, due to the low reproducibility of the analytical signals, it was impossible to work in the parts-per-billion range. This and the strong blank signals obtained led us to discard polyphosphoric acid as the suitable medium.

The influence of the sulfuric acid concentration was studied over the range $1.0\text{--}2.5\text{ mol L}^{-1}$, using chlorsulfuron concentrations of $0.1\text{--}1.0\text{ ppm}$, and a sulfuric acid concentration of 1.8 mol L^{-1} was adopted as optimal. Then, the effect of permanganate concentrations from 10^{-5} to $8 \cdot 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$ was examined, and $2 \cdot 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$ was chosen as optimal, as it provided an emission maximum at low analyte concentrations.

Photodegradation of CLS and Reaction Products

Photochemical studies of multichromophore systems have aroused much interest in recent years. Chlorsulfuron is a sulfonylurea with two photoactive chromophores, namely, a substituted benzene ring and an s-triazine. Caselli et al. (2001) studied the photochemistry of chlorsulfuron and used HPLC–UV to determine the major photoproducts obtained by irradiating. The excitation of benzene (280 nm) causes the elimination or substitution of the chlorine, whereas the absorption of the triazine chromophore (254 nm) results in an energy transfer to the sulfonylurea bridge and in the cleavage of the molecule. Although the particular chemical environment and irradiation conditions can alter the photodegradation pathway and its resulting products, because we used a low-pressure mercury lamp with an emission maximum at ca. 254 nm, the product of the irradiation and subsequent oxidation generating the chemiluminescence observed some compound produced via the latter pathway (viz. a sulfonamide or an s-triazine derivative). In support of this hypothesis is the well-known chemiluminescence of sulfonamides upon oxidation with acid permanganate (Pasekova et al. 2001).

Analytical Figures of Merit

The proposed method allows chlorsulfuron concentrations between 0.1 and 20 mg L^{-1} to be determined. The analytical signal and the CLS concentration are related by the following second-order polynomial

equation: $I = -85.489C^2 + 1626.3C + 444.14$ ($r^2 = 0.990$). The response of chlorsulfuron was linear over the concentration range $0.1-1.3 \text{ mg L}^{-1}$.

The reproducibility of the slope of the calibration curve (or relative standard deviation in experiments performed in different days), was determined by using two commercially available solid formulations of the analyte from (a) Dr Ehrenstorfer (98.5% purity) and (b) Riedel-de Haën (99.8% purity). The mean slope from five independent calibrations of chlorsulfuron (a) obtained using fresh solutions was $I = 2260C - 66$ ($r^2 = 0.991$, $\text{rsd} = 8.4\%$). That for six curves for chlorsulfuron (b) was $I = 2750C - 256$ ($r^2 = 0.992$, $\text{rsd} = 4.8\%$).

The rsd for the peaks, which is a measure of repeatability and reproducibility, was determined by using reagent (a) in 20 consecutive insertions of the same solution of 0.4 or 1.3 mg L^{-1} chlorsulfuron. The experiment was repeated on four different days, the mean rsd obtained being 3.8% at 0.4 mg L^{-1} and 3.4% at 1.3 mg L^{-1} chlorsulfuron. The limit of detection, which was taken to be the lowest pesticide concentration that yielded a signal equal to the blank signal plus three times its standard deviation, was 0.06 mg L^{-1} and was also determined using the reagent from Dr Ehrenstorfer. The time needed to obtain each transient signal as a peak was 141 s , so the throughput was 25 samples/h. The sample and reagent volumes required to obtain a peak were 860 and $820 \mu\text{L}$, respectively.

Table 1 shows the results of the study of potential interferences with the proposed method as applied to aqueous samples. Solutions of various anions and cations containing 0.6 mg L^{-1} chlorsulfuron were used for this purpose. The relative errors listed in the table indicate the differences between the

Table 1. Study of interfering compounds, for 0.6 mg L^{-1} of chlorsulfuron

Interferent	Concentration mg L^{-1}	R.e., %	Interferent	Concentration mg L^{-1}	R.e., %
K^+	500*	-0.32	Cl^-	770*	-1.39
Na^+	500*	-1.39	SO_4^{2-}	500*	+5.08
Ca^{2+}	200	-4.93	CH_3COO^-	500*	+2.26
NH_4^+	50	-4.57	HCO_3^-	500*	-0.74
Mg^{2+}	100*	-3.18	NO_2^-	0.05	-7.40
Ni^{2+}	1	+1.10	H_2PO_4^-	200	-4.95
Zn^{2+}	90	-5.43	NO_3^-	1	-1.66
Cu^{2+}	0.01	+12.1	$\text{NO}_3^-^b$	50*	-4.80
$\text{Cu}^{2+}{}^a$	3*	+1.78			

*Maximum assayed concentration.

^aAfter pretreatment with Duolite A-102D.

^bAfter pretreatment with Duolite C 20.

R.e., relative errors.

Chlorsulfuron—Photodegradation and Chemiluminometric Determination 191

signals provided by insertions of such solutions and one containing the same concentration of pesticide in deionized water. When the error exceeded 5%, a lower concentration of the potential interferent was tested.

Only nitrite and nitrate, which are photoactive (Mikuska and Vecera 2002; Gil-Torró, García-Mateo, and Martínez-Calatayud 1998), among the anions studied were found to interfere with the determination. Among the cations, Cu^{2+} posed the most severe interference, as it provided a chemiluminescent response under the operating conditions used. Therefore, for application to water samples, the two anions and the cation should be removed by passage through appropriate ion-exchange resins. We tested Amberlite 200 (cationic), Duolite C20 (cationic), and Duolite A-102D (anionic) for this purpose. The exchangers were prepared by packing Omnifit 5 cm \times 4 mm i.d. methacrylate chromatographic columns with the resins. Prior to use, each column was conditioned by passage of a 0.1 M NaOH or HCl solution. Their performance was checked with nitrate and cupric solutions; the signals provided by the reference solution (0.6 mg L^{-1} chlorsulfuron) were compared with those yielded by identical solutions additionally containing the ion concerned. As can be seen from Table 1, the results were favorable.

Application to Water Samples

The applicability of the proposed method, based on a photoreaction and the chemiluminescence phenomenon, was checked by analyzing samples of mineral water of two different origins with the optimized system based on sulfuric permanganate as oxidant. All samples were spiked with five different amounts of chlorsulfuron within the linear range of the method (viz. 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, and 1.25 mg L^{-1}). A linear regression of the concentrations added against those provided by the proposed method exhibited a unity slope and a zero intercept with three degrees of freedom and the 95% confidence interval; there were, therefore, no signs of proportional or systematic errors. The average recoveries were 109% and 95%, and no sample pretreatment was required.

CONCLUSIONS

The photoreaction–chemiluminescence binomial was, for the first time, successfully used in this work to determine chlorsulfuron in water. Samples, in a glycine buffer, are irradiated with a low-pressure mercury lamp for 100 s, and the irradiation product is oxidized by permanganate in a sulfuric acid medium to obtain chemiluminescent emission that is detected by a photomultiplier tube.

We explored the use of polyphosphoric acid instead of sulfuric acid in the oxidation reaction. Polyphosphoric acid can play a twofold role here, as it not only provides the acid medium required for the analyte to be oxidized but also facilitates light emission. Although it proved more sensitive than sulfuric acid

(it provided calibration curves with greater slopes), it resulted in less reproducible peaks; also, blank signals were very large, and the response at low analyte concentrations was no better, or even worse, than that obtained with sulfuric acid.

A discussion about the possible irradiation products is also included.

Finally, the use of solenoid valves allows the easy, complete automation of the process with low sample and reagent consumption.

REFERENCES

- Abbott, R.W., Townshend, A., and Gill, R. 1986. Determination of Morphine by Flow-Injection Analysis with Chemiluminescence Detection. *Analyst (London)*, 111 (6): 635–640.
- Alwarthan, A.A. and Townshend, A. 1986. Chemiluminescence Determination of Buprenorphine Hydrochloride by Flow-Injection Analysis. *Anal. Chim. Acta*, 185: 329–333.
- Amiott, E. and Andrews, A.R.J. 1997. Morphine Determination by HPLC with Improved Chemiluminescence Detection Using a Conventional Silica Based Column. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 20 (2): 311–325.
- Bauer, R. and Fallmann, H. 1997. The Photo-Fenton Oxidation—A Cheap and Efficient Wastewater Treatment Method. *Res. Chem. Intermed.*, 23: 341–354.
- Berrada, H., Molto, J.C., and Font, G. 2001. Gas Chromatographic Behaviour of Urea Herbicides. *Chromatographia*, 54 (5–6): 360–364.
- Bossi, R., Vejrup, K.V., Mogensen, B.B., and Asman, W.A.H. 2002. Analysis of Polar Pesticides in Rainwater in Denmark by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr.*, A 957 (1): 27–36.
- Brown, H.M. 1990. Mode of Action, Crop Selectivity and Soil Relations of the Sulfonylurea Herbicides. *Pestic. Sci.*, 29: 263–281.
- Caselli, M., Ponterini, G., and Vignali, M. 2001. Irradiation-Wavelength Dependent Photochemistry of the Bichromophoric Sulphunilurea Chlorsulphuron. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, 138: 129–137.
- Catalá Icardo, M., García Mateo, J.V., Fernández Lozano, M., and Martínez Calatayud, J. 2003a. Enhanced Flow-Injection-Chemiluminometric Determination of Sulphonamides by On-line Photochemical Reaction. *Anal. Chim. Acta*, 499: 57–69.
- Catalá Icardo, M., Misiewicz, M., Ciucu, A., García Mateo, J.V., and Martínez Calatayud, J. 2003b. Flow Injection-Online Photochemical Reaction for Direct Chemiluminescence Determination of Photodegraded Chloramphenicol. *Talanta*, 60: 405–414.
- Catalá-Icardo, M., García-Mateo, J.V., and Martínez Calatayud, J. 2002. Multicommutation as a Powerful New Analytical Tool. *Trends Anal. Chem.*, 21: 366–378.
- Catastini, C., Sarakha, M., Mailhot, G., and Bolte, M. 2002. Iron (III) Aquacomplexes as Effective Photocatalysts for the Degradation of Pesticides in Homogeneous Aqueous Solutions. *The Science of the Total Environment*, 298: 219–228.
- Chigrin, A.V., Umnov, A.M., Sokolova, G.D., Khokhlov, P.S., and Chkanikov, D.I. 1989. Determination of Chlorsulfuron by Immunoenzyme Analysis. *Agrokhimiya*, 8: 119–123.

Chlorsulfuron—Photodegradation and Chemiluminometric Determination 193

- Chivulescu, A., Catalá-Icardo, M., García-Mateo, J.V., and Martínez Calatayud, J. 2004. New Flow-Multicommutation Method for the Photo-Chemiluminometric Determination of the Carbamate Pesticide Asulam. *Anal. Chim. Acta*, 519: 113–120.
- Christie, T.J., Hanway, R.H., Paulls, D.A., and Townshend, A. 1995. Chemiluminescence Determination of Codeine by Permanganate Oxidation. *Anal. Proc. (London)*, 32 (3): 91–93.
- Coly, A. and Aaron, J.J. 1999a. Photochemically-induced Fluorescence Determination of Sulfonylurea Herbicides Using Micellar Media. *Talanta*, 49 (1): 107–117.
- Coly, A. and Aaron, J.J. 1999b. Sensitive and Rapid Flow-Injection Analysis of Sulfonylurea Herbicides in Water with Micellar-enhanced Photochemically Induced Fluorescence Detection. *Anal. Chim. Acta*, 392 (2–3): 255–264.
- Coly, A. and Aaron, J.J. 2000. Simultaneous Determination of Binary Mixture of Sulfonylurea Herbicides Using Micellar-enhanced Photochemically-induced Fluorescence First Derivative Spectra. *Luminescence*, 15 (2): 63–64.
- Coly, A. and Aaron, J.J. 2001. Simultaneous Determination of Binary Mixtures of Sulfonylurea Herbicides in Water by First-derivative Photochemically Induced Spectrofluorimetry. *J. AOAC. Int.*, 84 (6): 1745–1750.
- Concialini, V., Lippolis, M.T., and Galletti, G.C. 1989. Determination of Trace Amounts of Heavy Metals in Agricultural [Feeding-stuffs] By-products Using Anodic-stripping Voltammetry. *Analyst (London)*, 114: 1617–1619.
- Destereos, N.T., Grekas, N., and Calokerinos, A.C. 2000. Flow-injection-Chemiluminometric Determination of Albumin. *Anal. Chim. Acta*, 403 (1–2): 137–143.
- Dost, K., Jones, D.C., Auerbach, R., and Davidson, G. 2000. Determination of Pesticides in Soil Samples by Supercritical-Fluid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometric Detection. *Analyst (Cambridge, UK)*, 125 (10): 1751–1755.
- Eremin, S.A., Ryabova, I.A., Yakovleva, J.N., Yazynina, E.V., Zherdev, A.V., and Dzantiev, B.B. 2002. Development of a Rapid, Specific Fluorescence Polarization Immunoassay for the Herbicide Chlorsulfuron. *Anal. Chim. Acta*, 468 (2): 229–236.
- García Mateo, J.V.N.D. Multicommutation in Flow Analysis. www.uv.es/~martinej/Flow-Analysis.
- Gil-Torró, I., García-Mateo, J.V., and Martínez Calatayud, J. 1998. Flow-injection Biamperometric Determination of Nitrate (by Photoreduction) and Nitrite with the Nitrite/iodide Reaction. *Anal. Chim. Acta*, 366 (1–3): 241–249.
- Huston, P.L. and Pignatello, J.J. 1999. Degradation of Selected Pesticide Active Ingredients and Commercial Formulations in Water by the Photo-assisted Fenton Reaction. *Wat. Res.*, 33 (5): 1238–1246.
- Kelley, M.M., Zahnow, E.W., Petersen, W.C., and Toy, S.T. 1985. Chlorsulfuron Determination in Soil Extracts by Enzyme Immunoassay. *J. Agric. Food Chem.*, 33 (5): 962–965.
- Ludvigsen, G.H. and Lode, O. 2002. Trends of Pesticides in Norwegian Streams and Rivers (1996–2000). *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 82 (8–9): 631–643.
- Maurino, V., Minero, C., Pelizzetti, E., and Vincenti, M. 1999. Photocatalytic Transformation of Sulfonylurea Herbicides Over Irradiated Titanium Dioxide Particles. *Colloids and Surfaces A*, 151: 329–338.
- Menzinger, F., Schmitt-Kopplin, P., Freitag, D., and Kettrup, A. 2000. Analysis of Agrochemicals by Capillary Electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 891 (1): 45–67.

- Mikuska, P. and Vecera, Z. 2002. Chemiluminescent Flow-injection Analysis of Nitrates in Water Using On-line Ultraviolet Photolysis. *Anal. Chim. Acta*, 474 (1): 99–105.
- Mitsana-Papazoglou, A., Fragaki, A., Chamosfakidi, P., and Calokerinos, A.C. 2000. Chemiluminometric Behaviour of Erythromycin and Related Compounds. *Anal. Chim. Acta*, 410 (1–2): 153–157.
- Pasekova, H., Polasek, M., Cigarro, J.F., and Dolejsova, J. 2001. Determination of Some Sulfonamides by Sequential Injection Analysis with Chemiluminescence Detection. *Anal. Chim. Acta*, 438 (1–2): 165–173.
- Rocha, R.P.R., Reis, B.F., Zagatto, E.A.G., Lima, J.L.F.C., Lapa, R.A.S., and Santos, J.L.M. 2002. Multicommutation in Flow Analysis: Concepts, Applications and Trends. *Anal. Chim. Acta*, 468: 119–131.
- Segarra, R.O., Catalá Icardo, M., Gómez Benito, C., and Martínez Calatayud, J. 2003. FIA-Chemiluminescence Determination of Acridine Yellow. *Anal. Lett.*, 36 (5): 1039–1049.
- Voyskner, R.D. and Townsend, J.A. 2002. Online Automated Environmental Analysis with Ion-trap Mass-spectrometric Detection. *Am. Lab. (Shelton,-Conn)*, 34 (19): 18–20.
- Zhu, O.Z., Degelmann, P., Niessner, R., and Knopp, D. 2002. Selective Trace Analysis of Sulfonylurea Herbicides in Water and Soil Samples Based on Solid-phase Extraction Using a Molecularly Imprinted Polymer. *Environ. Sci. Technol.*, 36 (24): 5411–5420.

5.3 *Příloha 3: J. Klimundová, K. Mervartová, H. Sklenářová, P. Solich, M. Polášek, **Automated sequential injection fluorimetric set-up for multiple release testing of topical formulation**, Anal. Chim. Acta 573-574 (2006) 366-370*

Available online at www.sciencedirect.com

Analytica Chimica Acta 573–574 (2006) 366–370

ANALYTICA
CHIMICA
ACTAwww.elsevier.com/locate/aca

Automated sequential injection fluorimetric set-up for multiple release testing of topical formulation

Jana Klimundová, Kateřina Mervartová, Hana Sklenářová, Petr Solich*, Miroslav Polášek

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, Hradec Králové 50005, Czech Republic

Received 29 November 2005; received in revised form 17 February 2006; accepted 5 April 2006

Available online 25 April 2006

Abstract

A fully automated sequential injection analysis (SIA) device for simultaneous release testing of multiple ointment samples was devised and applied to the release testing of an ointment containing salicylic acid as an active substance. The SIA system consisted of a bi-directional 5 ml syringe pump, two 8-position selection valves, auxiliary peristaltic pump, fluorescence detector and three Franz cells maintained at 32 °C (water bath). The ointment sample was placed on top of a synthetic Millipore GTTP poly(carbonate) membrane (thickness 10 µm, pore size 0.2 µm) of the Franz cell containing 15 ml of aqueous phosphate buffer of pH 7.4 as the acceptor liquid. The samples of the acceptor liquid (50 µl) were aspirated in 15 min intervals for the period of 6 h from each of the 3 cells and dispensed to a fluorescence detector to determine the concentration of salicylic acid (excitation at 297 nm and emission at 405 nm). The volume of the acceptor medium taken for analysis was automatically replenished after each measurement. The calibration curve was rectilinear for 1–100 µg ml⁻¹ of salicylic acid. The device allowed simultaneous monitoring of the release tests for up to six cells including automated computer-aided evaluation of the release profile parameters.
© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Automation; Release; Sequential injection; Salicylic acid; Fluorescence

1. Introduction

In our previous communication [1] dealing with the automation of release studies of salicylic acid by sequential injection analysis (SIA) concept the release of the active substance from a semisolid pharmaceutical preparation was studied by an experiment based on the guidelines of FDA [2] and OECD [3]. The automated measurement was carried out with a single double-walled Franz cell linked to the SIA system.

The aim of the present paper is to improve substantially the simple system [1] by devising a novel automated SIA-based device for performing such tests (including on-line release data processing and evaluation) with several Franz type cells simultaneously. Contrary to previous work the diffusion cells employed are single-walled and they are placed in a water bath with thermostat to maintain the same temperature during the whole experiment. The new system complies well with technological guidelines requiring six replicates for one batch release measurement [2,3]. It is preferable to utilize a system involving several

Franz cells and to test both batches in the same run to ensure that the conditions during the test are the same for both batches compared.

Sequential injection analysis SIA [4] was introduced by the research group of Ruzicka and Marshall in 1990 and is now a well established analytical flow technique. The SIA technique is especially suitable for performing long-term automatic analysis [5–12].

The performance of the automated SIA device for carrying out simultaneous release tests with three or more Franz cells proposed in the present paper was examined with Belosalic ointment containing 3% salicylic acid as the active substance. Salicylic acid (2-hydroxybenzoic acid) belongs to the group of non-steroidal anti-inflammatory drugs. Externally, it is used for the treatment of acne, in higher concentrations it acts as a keratolytic therapeutic agent. We used native fluorescence of salicylic acid for its detection (excitation wavelength 297 nm and emission at 405 nm as described earlier [13]).

2. Experimental materials

The formulation tested was Belosalic dermal ointment 30 g (Belupo Pharmaceuticals and Cosmetics Ltd., Koprivnica,

* Corresponding author. Fax: +420 49 521 0718.

E-mail address: solich@faf.uni.cz (P. Solich).

Croatia) that contains 3% of salicylic acid and 0.05% of betamethasone. The standards of salicylic acid were obtained from Bochemie Group, Herbacos Bofarma Ltd., Czech Republic. All solutions were prepared from a Millipore Mili-Q RG ultra pure water. A stock solution of salicylic acid (1 mg ml^{-1}) was prepared by dissolving the appropriate amount of the drug in phosphate buffer pH 7.4 under sonication; it was stored in an amber glass bottle in a refrigerator. Diluted working solutions were prepared daily by appropriate dilution of the stock solution with the same phosphate buffer.

The phosphate buffer was prepared by dissolving 3.67 g of sodium hydrogen phosphate and 1.00 g of potassium dihydrogen phosphate in 500 ml of water; the pH was adjusted to 7.4 by phosphoric acid. 0.5 ml of a surfactant solution was added, the buffer was sonicated for 5 min and degassed by purging with helium for 10 min. The surfactant solution was prepared by diluting one drop of dish washer Jar plus (P&G - Rakona a.s., Czech Republic) in 50 ml of water.

A Millipore GTTP poly(carbonate) membrane with pore size $0.2 \mu\text{m}$ and thickness $10 \mu\text{m}$ was applied in the release studies.

A carrier solution was prepared by treating 300 ml of ultra-pure water with 0.5 ml of the surfactant solution (see above). The carrier solution was sonicated for 5 min and degassed by helium for 10 min.

3. Apparatus

The SIA system for release testing is depicted in Fig. 2. It was assembled around the FIALab 3500 (FIALab Instruments, USA) SIA analyzer comprising a 5 ml piston pump, peristaltic pump and an eight-port selection valve. Auxiliary eight-port selection valve (Vici Valco Instruments Co. Int., USA) served as an "auto-sampler" for introducing calibration standard solutions. Fluorimetric FIALab PMT-FL detector with D-1000-CE UV light source was connected as a detection unit. The detector was equipped with an Edmund Industrial Optics secondary emission filter (385 nm); the fluorescence signal integration time was 200 ms. A lab-made poly(methylmethacrylate) water bath was designed to accommodate up to nine Franz cells and a thermostat (heating immersion circulator Economy series ED, Julabo Labortechnik GmbH, Germany) maintaining the Franz cells (three pieces in real experiments) at 32°C . The water bath was perched on a Variomag POLY 15-position magnetic stirrer (USA).

All tubing of the SIA system was made of PTFE, i.d. 0.51 mm . The volume of the tubing connecting the sampling port of selector valve SV1 and the confluence point of the Y-piece (see Fig. 1) was approximately $6 \mu\text{l}$.

The Franz cells (Fig. 1) with calibrated internal volume of the acceptor compartment of 15 ml were manufactured in a glass workshop (Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Kralove, Czech Republic).

4. The measuring protocol and the SIA system

The samples of acceptor liquid from the Franz cell were aspirated through the Y-piece (Fig. 1) and dispensed into the flow cell

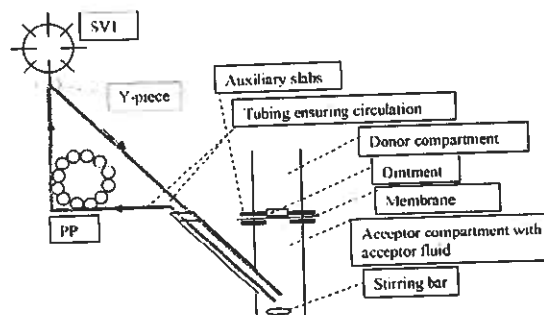


Fig. 1. Integration of Franz cell. SV1: selection valve; PP: peristaltic pump.

of the fluorescence detector. The peak height of the fluorescence signal was proportional to the concentration of salicylic acid. The commercial FIALab software supplied with the SIA analyzer allowed automatic calibration with standard solutions of salicylic acid introduced through selector valve SV2 (see Fig. 2) and calculation of the analyte concentration after each acceptor liquid aspiration.

4.1. Release testing

Initially, the membrane was conditioned in the phosphate buffer of pH 7.4 (liberation medium) for 30 min. This interval is shorter compared to 1 h (cf. our previous paper [1]) since we have found experimentally that such reduction of the conditioning time does not affect the release profile or lag-time.

Thereafter the sample of the ointment under study was spread onto the membrane to form a uniform layer filling the whole liberation aperture defined by a circular opening cut in the poly(methylmethacrylate) auxiliary slabs (Fig. 1). The prepared membrane was fixed between the slabs of the Franz cell, which was then placed in the water bath and the measurement was initiated. In an interval of 5 min the second and third conditioned membranes with samples of ointment were mounted on the other Franz cells. The time sequence of operations that processed during the analysis are summarized in Fig. 3. The entire liberation

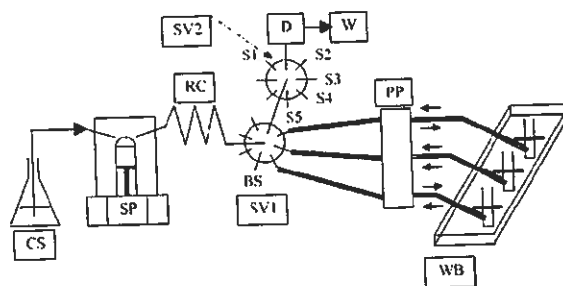


Fig. 2. Scheme of the proposed liberation system. CS: carrier stream; SP: syringe pump; RC: reaction coil; SV1: selection valve; SV2: additional selection valve; D: detector; W: waste; PP: peristaltic pump; WB: water bath; BS: buffer solution; S1–5: standard solutions of salicylic acid for calibration; selection valves 1 and 2, detector, peristaltic pump and syringe pump were controlled via computer.

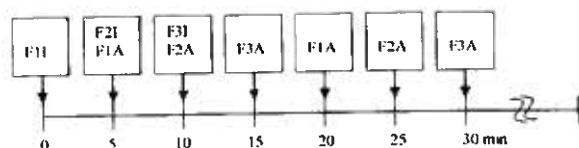


Fig. 3. Time sequence of operations. F1, F2, F3: Franz cell 1–3; I: initiation (the membrane with the sample mounted onto the acceptor compartment); A: sample of acceptor liquid aspirated and measured.

test took 6 h and afterwards the measurement of calibration standards and automated calculation of the release profiles for all three ointment samples followed.

The SIA procedure was controlled via computer program comprising two cycles:

- Collection of the release data from three Franz cells. The selection valve SV1 that was active during this step (switching among the three Franz cells) was linked to the detector via the auxiliary selection valve SV2. An auxiliary peristaltic pump was utilized to circulate the acceptor medium between the Franz cells and appropriate ports of SV1; the pump was automatically stopped when the sample of the acceptor medium was aspirated into the holding coil of the SIA system. Afterwards the taken volume of acceptor medium was replenished by the same volume of buffer solution BS via one port of the selection valve SV1 (see Fig. 2). This program loop was repeated 24 times.
- Washing of the ports before calibration and the calibration. The port 8 of selection valve SV1 was connected with the valve SV2 during washing of the ports of SV2 and during calibration measurements. Four measurements of each calibration solution were accomplished and the concentration of the salicylic acid in collected acceptor fluid samples was calculated automatically.

5. Theoretical background of the release study calculations

The sample uptake and replenishing with fresh medium influence the concentration of measured active compound. This is the reason for recalculation of the measured concentration to the real values of the active compound [14]:

$$C_{n,\text{corrected}} = C_{n,\text{measured}} + \text{volume}_{\text{sample}} / \text{volume}_{\text{acceptor FDC}} \times \sum C_{n-1,\text{measured}}$$

C_n is the concentration of n -sample, FDC is the Franz diffusion cell

The cumulative drug amount (Q_n) permeated at each time point related to the area of tested membrane is obtained as follows:

$$Q_n = C_{n,\text{corrected}} \times \text{volume}_{\text{acceptor FDC}} / \text{diffusion area}$$

Acquired data were linearized using the square root of time transformation and linear plots were obtained by plotting the cumulative amounts released (μg) per square root of time ($\text{h}^{-1/2}$).

The slope of the regression line represents the release rate of the product. This release rate is formulation-specific and can be used to control quality of the product.

6. Results and discussion

6.1. The device for ointment release testing

In our previous study, regarding the automation of ointment release testing [1], the proposed device involved a single thermostated double-walled Franz cell. When designing an apparatus for simultaneous release testing of three or six samples it became obvious that the application of such type of Franz cell is impractical. Therefore an open water bath was designed to accommodate up to nine single-walled Franz cells and a thermostat (heating immersion circulator) maintaining the Franz cells at 32 °C. A special plastic holder fixed the cells in the water bath in upright position just above the stirring panels of a multi-position magnetic stirrer. The acceptor liquid in the Franz cells was continuously stirred during the entire release test with the aid of PTFE-coated stirring bars.

6.2. The SIA system optimization

To minimize the dead volume of the sample loading system the acceptor liquid was continuously circulated from the acceptor compartment of the Franz cell to the port of the selector valve SV1 and back with use of a peristaltic pump in the same way as it was in previous work. This ensured that the concentration of salicylic acid in the taken sample was the same as in the bulk acceptor solution.

It was impossible to start the measurement of three ointment samples at once because the release test measurement can be commenced for each Franz cell only after mounting the membrane with the sample. Therefore, the interval between the initiation of next Franz cell measurement was set to five minutes. The time of the first measurement of the concentration of salicylic acid in the acceptor liquid was 5 min after the initiation of the respective cell and thereafter the measurements were performed regularly in 15 min intervals for each cell (see Fig. 3).

Auxiliary selection valve SV2 serving for the calibration was linked to the SIA system through the RS323 port; the SV2 was controlled by the PC with use of the original FIALab software. The configuration of the selection valves was set as depicted in Fig. 2.

6.3. The test of the optimized system

In initial experiments the formation of small air bubbles in the SIA conduits became a serious problem since they were retained in the detector flow cell and influenced negatively the fluorescence signal. This problem was overcome by treating the phosphate buffer (acceptor medium) with a small amount of a surfactant and degassing the carrier liquid (water) and the buffer; sonication for 5 min and subsequent bubbling with helium for 10 min was satisfactory. The effect of the surfactant addition on

the fluorescence signal of salicylic acid was examined. Signals of standard solution of $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ salicylic acid in phosphate buffer without and with the addition of surfactant were compared. Each determination was repeated in quadruplicate. No statistically significant difference between these signals was observed; hence the surfactant did not interfere with the detection of salicylic acid.

The repeatability of the SIA-fluorimetric determination of salicylic acid was estimated by running a simulated release test with three Franz cells (with dismounted membrane) containing a standard solution of $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ salicylic acid in the acceptor compartment. The RSD of the mean fluorescence signal was 1.27% (20 measurements).

6.4. The parameters for salicylic acid analysis

The conditions for the SIA assay of salicylic acid were adopted from our previous work [1] where the aspirated sample volume was $50 \mu\text{l}$ and the flow rate was $50 \mu\text{l s}^{-1}$. The original calibration range of $0.05\text{--}10 \mu\text{g ml}^{-1}$ of salicylic acid had to be widened because the concentration of salicylic acid eventually exceeded $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ in the acceptor medium during real release testing. New calibration was carried out with six standard solutions covering the range $1\text{--}100 \mu\text{g ml}^{-1}$ of salicylic acid. The regression equation for linear response was $I = 7565.2c + 2901.3$ where I stands for the intensity of fluorescence (arbitrary units) and c is concentration of salicylic acid in $\mu\text{g ml}^{-1}$; correlation coefficient $r^2 = 0.9988$.

The limit of detection was $0.01 \mu\text{g ml}^{-1}$ (3σ) and the limit of quantification was $0.03 \mu\text{g ml}^{-1}$ (10σ) [1].

6.5. The release testing of real samples (ointments)

The primary records of simultaneous automated SIA release testing of three samples of the same batch of the Belosalic ointment are shown in Fig. 4. The test with three samples was repeated twice and the mean values for six liberation profiles were linearized. The linear graph was obtained by plotting released amount of salicylic acid per area (Q_n) versus the square root of time elapsed (t_n). The corresponding equation obtained by linear regression was $Q_n = 58.487\sqrt{t_n} - 28.924$ with correlation coefficient $r^2 = 0.9918$ (see Fig. 5).

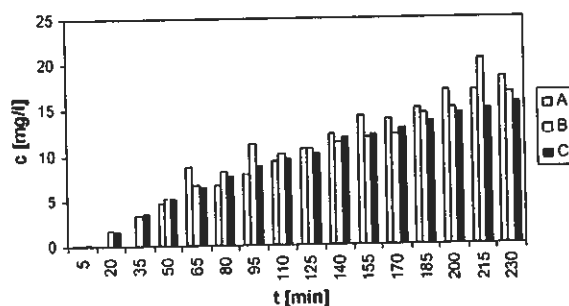


Fig. 4. Record of three measurements (A, B, C). The bars express measured concentration without correction.

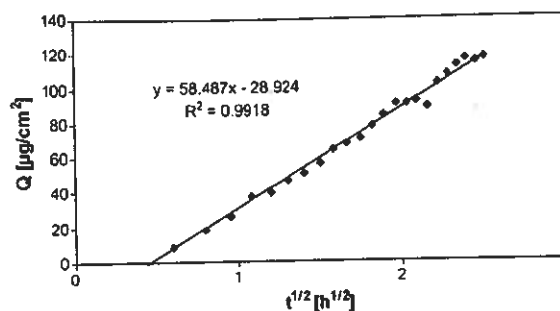


Fig. 5. The linear liberation profile was obtained from average of six measurements. Q_n ... the released amount of salicylic acid across unit of area.

7. Conclusions

Fully automated SIA device for simultaneous release testing of multiple ointment samples was invented. Proper functioning of the device comprising three Franz cells was successfully demonstrated by release testing of real ointments containing salicylic acid. The number of concurrently monitored Franz cells could be possibly increased to six if a six-channel peristaltic pump is employed for effecting the acceptor liquid circulation.

The proposed system is a cost-effective tool for studying the release characteristics of semisolid formulations and also for carrying out batch to batch uniformity tests. Its possible use in bioavailability studies and in the development of skin permeation enhancers will be a subject to further investigations.

Acknowledgement

Financial support by the Grant Agency of Charles University, Grant No. 313/2005/B-CH/FaF and by the Czech Ministry of Education, Research Projects MSM 0021620822 and FRV/S No. 389/2005 is gratefully acknowledged.

References

- [1] J. Klimundová, H. Sklenářová, U.F. Schaefer, P. Solich, J. Pharm. Biomed. Anal. 37 (2005) 893.
- [2] SUPACC SS, FDA (1997) Guidance for Industry, Nonsterile Dosage Forms, SUPACC SS, CMC7, 19.
- [3] OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Toxicity and Assessment No. 28 (2002), Draft Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies, 15.
- [4] J. Růžicka, G.D. Marshall, Anal. Chim. Acta 237 (1990) 329.
- [5] X.-Z. Liu, Z. L. Fang, Anal. Chim. Acta 358 (1998) 103.
- [6] H. Paseková, M.G. Sales, M.C. Montenegro, A.C. Araújo, M. Políšek, J. Pharm. Biomed. Anal. 24 (2001) 1027.
- [7] Z. Legnerová, H. Sklenářová, P. Solich, Talanta 58 (2002) 1151.
- [8] Z. Legnerová, D. Šatínský, P. Solich, Anal. Chim. Acta 497 (2003) 165.
- [9] Z. Legnerová, J. Huelová, R. Thum, P. Solich, J. Pharm. Biomed. Anal. 34 (2004) 115.
- [10] P.C.A.G. Pinto, M.L.M.F.S. Saraivo, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, Talanta 38 (2006) 857.

370

J. Klimundová et al. / Analytica Chimica Acta 573-574 (2006) 366-370

- [11] X.-Z. Liu, S. S. Liu, J. F. Wu, Z.-L. Fang, *Anal. Chim. Acta* 392 (1999) 273.
- [12] P. Solich, H. Sklenarova, J. Huelova, D. Satinsky, U.F. Schaeffer, *Anal. Chim. Acta* 499 (2003) 9.

[13] P. Solich, E. Ogrocká, U. Schaefer, *Pharmazie* 56 (2001) 787.

- [14] H. Wagner, et al., Human skin and skin equivalents to study dermal penetration and permeation, in: C. M. Lehr (Ed.), *Cell Culture Models of Biological Barriers*, Taylor & Francis, London, 2002, p. 289.

- 5.4 ***Příloha 4: K. Mervartová, M. Polášek, J. Martínez Calatayud, Sequential injection analysis (SIA) – chemiluminescence determination of indomethacin using tris[(2,2'-bipyridyl)]ruthenium(III) as reagent and its application to semisolid pharmaceutical dosage forms, Anal. Chim. Acta 600 (2007) 114-121***

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Sequential injection analysis (SIA)-chemiluminescence determination of indomethacin using tris[(2,2'-bipyridyl)]ruthenium(III) as reagent and its application to semisolid pharmaceutical dosage forms

Kateřina Mervartová^{a,*}, Miroslav Polášek^a, José Martínez Calatayud^b

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, CZ-500 05 Hradec Králové, Czech Republic

^b Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Valencia, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history

Received 19 October 2006

Received in revised form

3 January 2007

Accepted 19 January 2007

Published on line 26 January 2007

Keywords:

Indomethacin

Sequential injection analysis

Chemiluminescence

Tris(bipyridyl)ruthenium complex

Pharmaceuticals

Semisolid dosage forms

ABSTRACT

Automated sequential injection (SIA) method for chemiluminescence (CL) determination of nonsteroidal anti-inflammatory drug indomethacin (I) was devised. The CL radiation was emitted in the reaction of I (dissolved in aqueous 50% v/v ethanol) with intermediate reagent tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(III) ($\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$) in the presence of acetate. The $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$ was generated on line in the SIA system by the oxidation of 0.5 mM tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) ($\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$) with Ce(IV) ammonium sulphate in diluted sulphuric acid. The optimum sequence, concentrations, and aspirated volumes of reactant zones were: 15 mM Ce(IV) in 50 mM sulphuric acid 41 μL , 0.5 mM $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ 30 μL , 0.4 M Na acetate 16 μL and I sample 15 μL ; the flow rates were 60 $\mu\text{L s}^{-1}$ for the aspiration into the holding coil and 100 $\mu\text{L s}^{-1}$ for detection. Calibration curve relating the intensity of CL (peak height of the transient CL signal) to concentration of I was curvilinear (second order polynomial) for 0.1–50 μM I ($r = 0.9997$; $n = 9$) with rectilinear section in the range 0.1–10 μM I ($r = 0.9995$, $n = 5$). The limit of detection (3σ) was 0.05 μM I. Repeatability of peak heights (R.S.D., $n = 10$) ranged between 2.4% (0.5 μM I) and 2.0% (7 μM I). Sample throughput was 180 h^{-1} . The method was applied to determination of 1 to 5% of I in semisolid dosage forms (gels and ointments). The results compared well with those of UV spectrophotometric method.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Indomethacin (1-(*p*-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-3-indolylacetic acid) is a nonsteroidal anti-inflammatory drug exhibiting analgesic, anti-inflammatory and antipyretic effects. Its chemical structure is depicted in Fig. 1. Indomethacin gels and ointments are broadly used for calming down acute joint and backbone pain and for the treatment of degenerative diseases of joints and ligaments such as

rheumatoid arthritis, osteoarthritis and ankylotic spondylitis; on the other hand oral administration of indomethacin may cause severe side effects including irritation of stomach [1,2].

The British Pharmacopoeia [3] uses a titration method for the determination of indomethacin which is time consuming and impractical for routine analyse.

A number of papers have been published concerning determination of indomethacin by various analytical methods in different matrices of pharmaceutical or biomedical

* Corresponding author. Tel.: +420 495067391; fax: +420 495067164.

E-mail address: Katerina.Mervartova@faf.cuni.cz (K. Mervartova).
0003-2670/\$ – see front matter © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.aca.2007.01.057

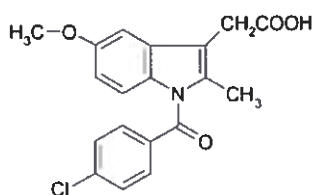


Fig. 1 – Structural formula of indomethacin.

interest. Among them separation methods, namely liquid chromatography [4–14] and capillary zone electrophoresis [15,16] using UV spectrophotometric [3–11,15,16] or mass spectrometric detection [13,14] with limit of quantification (LOQ) of 1.1 nM indomethacin attained the leading position. Recently indomethacin was determined in injections by derivative UV spectrophotometry [17] and by spectrophotometry in visual region with use of molybdate as colour reagent [18]. SIA with fluorescence detection based on alkaline hydrolysis of indomethacin (leading to formation of fluorescing products) was used for its assay in pharmaceutical formulations [19] including automated drug release studies [20]. Adsorptive stripping voltammetry [21–24] with LOD values approaching 0.7 nM of indomethacin and room-temperature phosphorimetry on a poly(vinyl alcohol) substrate [25] are among other methods devised previously for the determination of this drug.

To our best knowledge only one chemiluminescence (CL) method for the determination of indomethacin was published so far [26]. This flow injection – CL method uses non-selective CL reaction of indomethacin with soluble Mn(IV) species and formaldehyde for the assay of $>40 \text{ ng mL}^{-1}$ ($\approx 0.1 \mu\text{M}$) of indomethacin in urine; the interferences were overcome by using selective absorption and pre-concentration of the analyte in a column packed with appropriate molecular imprinted polymer. A single assay (1 injection) took almost 3.5 min.

Several well established CL reaction systems of analytical relevance [27,28] (based, e.g., on luminol, lucigenin, lophine, peroxyoxalate, sulphite, Ce(IV), Mn(VII) and Ru(III) complexes) have been extensively utilized in practice especially in connection with flow methods (FIA, SIA) in the recent decade. The $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$ complex can oxidize oxalate or some nitrogenous organic compounds while being reduced to excited $[\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}]^*$ species emanating visible light with maximum emission at 610 nm [29]. The $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$ reagent is relatively unstable molecule which needs to be prepared in situ from $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ by chemical, photochemical or electrochemical oxidation. Chemical oxidation of $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ is accomplished for example with Ce(IV) [30–32] or with permanganate [33,34] in acidic medium. Many important drugs contain nitrogen atoms in their molecules; hence the $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$ has high potential to become useful reagent for their CL determination. Chemiluminescence of some indole derivatives (indole, indole-3-acetic acid, tryptophan, psilocin and psilocybin) in the reaction with $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$ was described previously [35–37].

Automated flow methods such as FIA and especially SIA proved to be powerful tools in solving practical problems occurring in the field of quality assurance of pharmaceuticals [38,39]. One of the advantages of SIA is feasibility of on-line preparation of unstable reagents and at the same time sub-

stantial reduction of waste generation as well as minimizing the consumption of sample and reagents.

In our preliminary experiments we used the SIA-CL technique for screening a number of drugs (bulk substances) containing nitrogen atoms in their molecules as potential analytes possibly giving rise to chemiluminescence radiation in the reaction with $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$ generated via chemical oxidation of $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ by Ce(IV) directly in the SIA system. Indomethacin showed promising CL response usable for its sensitive SIA-CL determination. The present work is dealing with the development and validation of automated rapid and sensitive SIA-CL method suitable for the assay of indomethacin in semisolid dosage forms (gels and ointments) involving evaluation of its accuracy by comparison with reference UV spectrophotometric method [17].

2. Experimental

2.1. Apparatus

The SIA system was built from CAVRO XL 3000 piston pump (volume 2.5 mL Cavro Scientific Instruments Inc., USA), Vici Valco ten-port selection valve with electrical actuator (Valco Instruments Co., Inc., USA), model FS 970 Schoeffel Instrument Corp. (USA) fluorimetric flow detector (UIV lamp switched off) equipped with a lab-made CL module with spiral geometry; the photomultiplier tube voltage was 320 V. The SIA system involved a holding coil (length 70 cm, i.d. 0.75 mm, PTFE tubing, volume 1.2 mL) and a PTFE tubing (i.d. 0.75 mm). The same tubing was spirally coiled on a 52 mm \times 52 mm Perspex plate, which substituted the secondary filter in the fluorimeter; this CL module had a central inlet, peripheral outlet and the diameter of the spiral was 24 mm. The control unit consisted of Pentium 75 MHz PC equipped with additional AT-MIO-16E10 data acquisition and AT-232/4 interface cards (National Instruments Corporation, USA). The whole system was operated by software (FaFSIA, Version 1.2); advanced data calculation and analysis were performed by LPMcalc, Version 1.0 (lab-made programs written in LabVIEW[®]). The optimization was carried out by our own simplex MS DOS software. Schematic view of the employed SIA manifold is shown in Fig. 2.

The solution stability monitoring and UV spectrophotometry was performed on Agilent UV-vis photodiode array spectrophotometer (Model HP 8453). The CL emission spectra were measured by Shimadzu RF-1501 spectrofluorophotometer.

2.2. Reagents

All solutions were prepared from analytical grade chemicals and a Millipore Milli-Q RG ultra pure water. Standard of indomethacin was obtained from Jiangsu Taicang, China and stored in refrigerator. Tris(2,2'-bipyridyl)dichlororuthenium(II) hexahydrate, acetonitrile, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), sodium dodecylsulphate (SDS), triton X-100 and methanol were purchased from Sigma-Aldrich, Chemie GmbH (Germany). Cerium(IV)-ammonium sulphate was purchased from Fluka (Switzerland). Potassium dihydrogen phosphate and sodium hydrogen phosphate were from Merck (Germany). Acetone, sulphuric acid, potassium permanganate, sodium

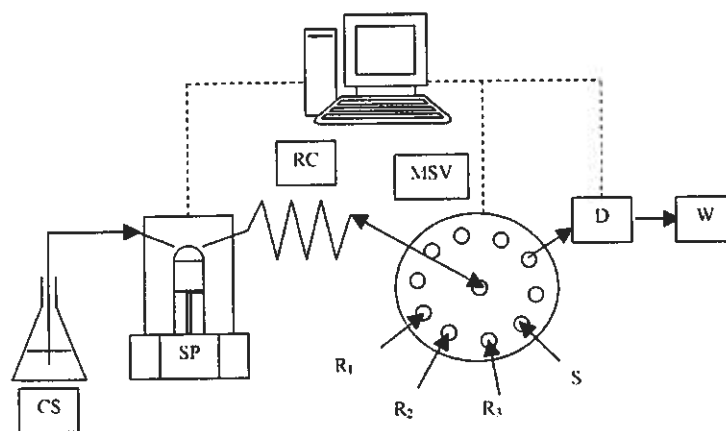


Fig. 2 – Schematic view of SIA manifold: CS, carrier stream; SP, syringe pump; RC, holding coil; MSV, multi-position selection valve; D, detector; W, waste; R₁, Ce(IV) in sulphuric acid; R₂, Ru(bipy)₃²⁺ complex; R₃, buffer; S, indomethacin sample in 50% ethanol.

hydroxide, acetic acid, sodium acetate, orthophosphoric acid, ethanol, hydrochloric acid and boric acid were obtained from Lachema (Czech Republic). Indomethacin was determined in Indobene gel (Merckle GmbH, Germany) and in Vonum cutan ointment (Pharmaceutica GmbH, Germany).

Stock solution of 0.1 mM indomethacin was prepared by dissolving appropriate amount of the substance in ethanol; it was stored at 4 °C. This solution was stable for at least 2 days as found by measuring its UV spectrum. Working solutions were prepared by diluting the stock solution with aqueous 50% (v/v) ethanol.

The buffers used in the experiments were 0.2 M acetate buffer (pH 5–5.6), 0.067 M phosphate buffer (pH 6–8) and Britton–Robinson buffer (pH 2–10).

2.3. SIA procedure

Appropriate volumes of indomethacin test solution or blank, solution of Ru(bipy)₃²⁺, buffer and Ce(IV) in sulphuric acid were automatically aspirated in optimum order into the holding coil, the zones were mixed by flow reversal and the arising CL product was pushed into the detector cell. The transient CL signal was recorded in the form of peaks and processed by our original software written in LabVIEW (involving the peak height calculations in nA). Each measuring cycle was carried out five times at ambient temperature and the mean values of the peak heights and their standard deviations were computed automatically. The net CL signal was calculated by subtracting the mean blank signal from the mean raw signal value where appropriate.

2.4. Optimization

Results of preliminary experiments indicated that the optimum order of the reactant zones aspirated into the holding coil was: (i) Ce(IV) sulphate in sulphuric acid, (ii) aqueous Ru(bipy)₃²⁺, (iii) buffer solution, and (iv) test solution of indomethacin. This order was applied in all subsequent experiments.

2.4.1. Chemical parameters

Initially the effect of the concentration of the individual reactants on the net CL response of 15 µL of 1 µM indomethacin in aqueous 25% (v/v) ethanol was examined by the univariate technique (the concentration of the reactant examined was changed while the other concentrations were fixed). Flow rate of aspirating the zones of the reactants into the holding coil (FRa) was 25 µL s⁻¹ and the flow rate of aspirating the zone of emitting species into the detector (FRd) was 100 µL s⁻¹.

The aspirated volume of the Ce(IV) sulphate in sulphuric acid zone was 70 µL and the concentrations were varied in the range 5–20 mM Ce(IV) and 10–100 mM H₂SO₄. The aspirated volume of the Ru(bipy)₃²⁺ zone was 30 µL and the concentration of Ru(bipy)₃²⁺ changed in the range 0.1 to 5 mmol L⁻¹. The volume of the buffer solution aspirated was 30 µL and the pH varied between 2 and 10 for the Britton–Robinson universal buffer, pH 6–8 for 0.067 M phosphate buffer and pH 5.0–5.6 for 0.2 M acetate buffer; 0.1–0.5 M sodium acetate was also used instead of the acetate buffer.

The effect of the content of 5–15% (v/v) of acetone, 5–15% (v/v) of acetonitrile, 25–100% (v/v) of methanol and 25–75% (v/v) of ethanol in the injected 1 µM indomethacin solution on the net CL intensity was tested at optimized Ce(IV), sulphuric acid, Ru(bipy)₃²⁺ and Na acetate concentrations. In addition possible enhancement of the CL intensity by selected surfactants was examined by treating the injected 1 µM indomethacin solution in 20% (v/v) ethanol with appropriate surfactant to contain 0.02 to 0.21% of Triton X-100, 5 to 80 mM sodium dodecylsulphate or 1 to 10 mM cetyltrimethylammonium bromide.

2.4.2. SIMPLEX optimization of flow parameters

With optimized concentrations of the reactants the volumes of the reagents and the flow rates FRa and FRd were optimized simultaneously by the multi-variate computer-aided SIMPLEX method using a MS DOS software devised in our laboratory. The sample was 15 µL of 1 µM indomethacin in 50% (v/v) ethanol; its volume was maintained constant during the whole SIMPLEX process. The lower and upper limits of FRa and

FRd were $25 \mu\text{L s}^{-1}$ and $150 \mu\text{L s}^{-1}$ and the aspirated volumes of the reagent zones were optimized within the range $5 \mu\text{L}$ to $100 \mu\text{L}$.

2.5. Calibration curve, LOD, repeatability, robustness

Calibration was performed under the optimum conditions with nine standard solutions of indomethacin covering the concentration range 0.1 – $50 \mu\text{mol L}^{-1}$. For each standard solution five replicate injections were carried out. The calibration data were evaluated by non-linear curve fitting and by linear regression analysis with use of SlideWrite V6 software.

The LOD was calculated by the 3S/N method as the concentration of indomethacin giving rise to CL signal exceeding three times the standard deviation of the blank signal.

The repeatability of the CL peak heights was estimated by performing 10 replicate injections of two standard solutions containing $0.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $7 \mu\text{mol L}^{-1}$ of indomethacin; the relative standard deviation (R.S.D.) of the mean peak height was calculated for either concentration of indomethacin.

The robustness of the method was estimated by examining the effect of varying the concentrations of $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$, $\text{Ce}(\text{IV})$ and sulphuric acid, and Na acetate and their aspirated volumes as well as FRa and FRd within $\pm 10\%$ around their final optimized values.

2.6. Analysis of pharmaceutical formulations

2.6.1. Procedure for the assay of indomethacin in gel or ointment by the SIA-CL method

Two commercially available semisolid dosage forms were analysed, namely Indobene gel and Vonum cutan ointment. Approximately 0.25 g of a gel or ointment sample was weighed into a 100 mL volumetric flask containing 50 mL of ethanol and the mixture was sonicated for 10 min . Thereafter the volume was adjusted to 100 mL with ethanol and the suspension was filtered through a membrane filter (Nylon syringe filter, pore size $0.45 \mu\text{m}$, Teknokroma, Spain). A 1-mL (for gel sample) or 0.5-mL (for ointment) portion of the filtrate was diluted with aqueous 50% (v/v) ethanol to 25 mL in a volumetric flask; this test solution was directly analysed by the proposed SIA-CL method under the optimum conditions with use of calibration curve covering the range 1 to $10 \mu\text{M}$ indomethacin. Five separately weighed samples of each formulation were analysed and for each test solution five replicate injections were carried out.

2.6.2. Recovery experiments

A 0.25-g sample of the ointment or gel was treated with known volume of a standard solution of indomethacin in ethanol to increase the original content of indomethacin by 40 to 100% . Thereafter the spiked sample was analysed by the SIA-CL method as described above and the recovery of the added amount of indomethacin was calculated. The recovery experiments were run in triplicate for each formulation.

2.6.3. Procedure for the UV spectrophotometric assay of indomethacin [17]

A 2.00-g sample of a gel or 0.40-g sample of an ointment was weighed into a 50-mL volumetric flask containing 20 mL

of methanol. Thereafter 20 mL of methanol was added, the mixture was sonicated for 10 min and diluted to 50 mL with methanol. The suspension produced was filtered through the Teknokroma membrane filter (see above), a 2-mL portion of the filtrate was transferred into a 25-mL volumetric flask, 0.5 mL of 1 M HCl was added and the volume was adjusted to 25 mL with methanol. Absorbance of this solution was measured at 318 nm in a 1-cm fused silica cell and corrected for the baseline absorbance measured at 450 nm . The reference standard solution of indomethacin ($32 \mu\text{g mL}^{-1}$) in methanol contained 20 mM HCl . Five separately weighed samples of each formulation were analysed.

2.6.4. Accuracy

The accuracy of the proposed SIA-CL method was evaluated by the statistical Student's *t*-test [42]. Such a test involved comparison of the results of indomethacin determination in Indobene gel and Vonum cutan ointment as found by the SIA-CL method and by the UV spectrophotometry [17].

3. Results and discussion

3.1. Optimization of chemical parameters

The only CL method for determining indomethacin published to date is a flow-injection assay based on its reaction with soluble $\text{Mn}(\text{IV})$ species in the presence of formaldehyde as an enhancer [26]; this method allowed to determine $\geq 0.1 \mu\text{M}$ indomethacin at relatively low sample throughput of $< 20 \text{ h}^{-1}$. Therefore, we attempted to devise another CL method that would be faster and at least as sensitive as the previous one. Initially we found that no CL is emitted if indomethacin is allowed to react directly with acidified solutions of permanganate or $\text{Ce}(\text{IV})$ as reagents commonly used in many CL assays. Since the CL of some indole derivatives was observed earlier [35–37] when unstable $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$ species was used as oxidant, we decided to employ relatively stable $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ as the reagent in combination with the SIA technique for automated in situ formation of $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$ and its on-line CL reaction with indomethacin. We found that the only sequence of reactant zones aspirated into the holding coil leading to CL emission is $\text{Ce}(\text{IV})$ in sulphuric acid - $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ - acetate buffer - indomethacin. The orange light emitted showed maximum emission at 590 – 610 nm ; this fact indicates that the emitting species is excited $[\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}]^*$ [29]. There was no CL signal detected if $\text{Ce}(\text{IV})$ was substituted by MnO_4^- .

Sulphuric acid forms complexes with $\text{Ce}(\text{IV})$; it has been already pointed out that the reactive species of $\text{Ce}(\text{IV})$ are $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ and $\text{H}[\text{Ce}(\text{SO}_4)_3]^-$ [40,41] and hence the concentration of sulphuric acid should influence the reactivity of $\text{Ce}(\text{IV})$ with $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$. On the other hand extremely high acidity of the $\text{Ce}(\text{IV})$ reagent could cause decomposition of the $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ complex. It was found that the intensity of CL increases when decreasing concentration of H_2SO_4 down to 0.05 mol L^{-1} but further decrease of its concentration results in the formation of precipitate in the flow system; therefore $0.05 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ was selected as the optimum parameter. The intensity of CL increased when increasing concentration of $\text{Ce}(\text{IV})$ from

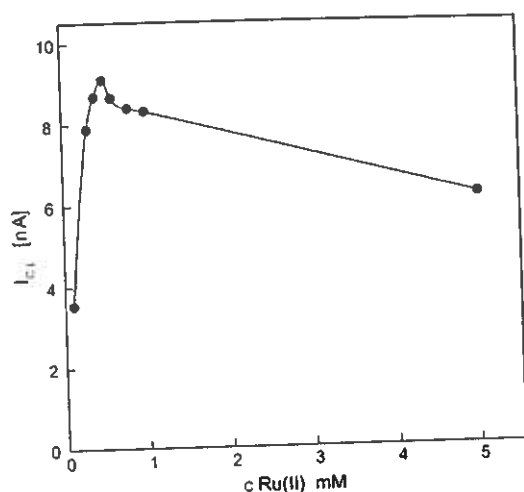


Fig. 3 - Dependence of the intensity of CL on the concentration of $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ complex 15 μL of 1 μM indomethacin in 25% (v/v) ethanol injected; Reagent zones aspirated: 70 μL of 15 mM $\text{Ce}(\text{IV})$ in 50 mM H_2SO_4 , 30 μL of $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$, 30 μL of 0.2 M acetate buffer pH 5.4; $\text{FRa} = 25 \mu\text{L s}^{-1}$; $\text{FRd} = 100 \mu\text{L s}^{-1}$.

5 to 15 mmol L^{-1} and it practically did not change for 20 mM $\text{Ce}(\text{IV})$; hence the optimal concentration of $\text{Ce}(\text{IV})$ was set to 15 mmol L^{-1} . The effect of the concentration of $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ is depicted in Fig. 3; it can be seen that maximum CL response was attained for 0.5 mM $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$.

The CL signal increased with increasing the pH of the 0.2 M acetate buffer from 5 to 5.6. There was no CL emission if acetate buffer was substituted by water, by phosphate buffer of pH 6 to 8 or by Britton-Robinson buffer of pH 2 to 10. Apparently the presence of acetate is essential for the formation of the CL emitting species. Replacement of the acetate buffer by plain sodium acetate solution resulted in further growth (by 126% compared to 0.2 M acetate buffer of pH 5.6) of the CL signal; optimum concentration of the aspirated sodium acetate solution was 0.4 mol L^{-1} .

Indomethacin is sparingly soluble in water but well soluble in common organic solvents such as methanol, ethanol, acetone and acetonitrile. Therefore, its stock solution as well as the working and standard solutions were prepared in organic or mixed aqueous-organic media. The effect of the content of selected organic solvents in the injected test solution of indomethacin on the intensity of CL is shown in Fig. 4. It can be concluded that ethanol exhibits the best sensitizing effect and that its optimum content in the injected sample is 50% (a 40% increase of CL intensity compared to sample containing 25% of ethanol is achieved). Anionic and cationic surfactants examined (see Section 2) did not influence the intensity of CL; insignificant increase of less than 20% of the original value was observed if the injected sample contained about 0.2% of non-ionic surfactant Triton X-100; in view of this fact no surfactants were employed in further experiments.

To recapitulate, the optimum concentrations of the reactants in the aspirated zones were 15 mM $\text{Ce}(\text{IV})$ in 50 mM

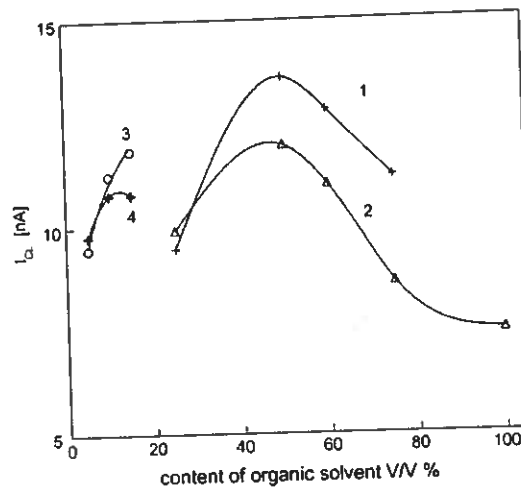


Fig. 4 - Influence of the content of organic solvent in the injected indomethacin solution on the intensity of CL. 15 μL of 1 μM indomethacin in appropriate solvent injected. Reagent zones aspirated: 70 μL of 15 mM $\text{Ce}(\text{IV})$ in 50 mM H_2SO_4 , 30 μL of 0.5 mM $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$, 30 μL of 0.4 M Na acetate; $\text{FRa} = 25 \mu\text{L s}^{-1}$; $\text{FRd} = 100 \mu\text{L s}^{-1}$. Curve 1: ethanol, curve 2: methanol, curve 3: acetone, curve 4: acetonitrile.

H_2SO_4 , 0.5 mM $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$, 0.4 M Na acetate, and 50% (v/v) of ethanol in the injected test solution of indomethacin.

3.2. SIMPLEX optimization of flow parameters

Sixteen SIMPLEX vertexes were run to optimize the volumes of the aspirated zones of the reactants (except of the zone of 1 μM indomethacin with fixed volume of 15 μL) and the flow rates FRa and FRd in terms of achieving maximum intensity of CL. The process was initiated with 70 μL of 15 mM $\text{Ce}(\text{IV})$ in 50 mM H_2SO_4 , 30 μL of 0.5 mM $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ and 30 μL of 0.4 M Na acetate. The initial flow rates were $\text{FRa} 25 \mu\text{L s}^{-1}$ and $\text{FRd} 100 \mu\text{L s}^{-1}$.

After nine vertexes the CL intensity increased by 20% relative to the initial value and it did not improve with further runs. Hence the final optimum conditions found after the 9th vertex were 41 μL of 15 mM $\text{Ce}(\text{IV})$ in 50 mM H_2SO_4 , 30 μL of 0.5 mM $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$, 16 μL of 0.4 M sodium acetate, $\text{FRa} 60 \mu\text{L s}^{-1}$ and $\text{FRd} 100 \mu\text{L s}^{-1}$. The optimum time sequence of the SIA control programme is summarized in Table 1.

3.3. Calibration curve, LOD, repeatability, robustness

The best curve fit of the calibration data covering the whole concentration range of 0.1–50 μM indomethacin (nine concentrations) examined was a second degree polynomial: $I = -0.156c^2 + 22.193c + 0.767$ ($r = 0.9997$; $n = 9$) where I stands for the mean peak height (CL intensity in nA) and c is concentration of indomethacin (μM). The deviation from rectilinearity in CL methods is a commonly known phenomenon that may be caused for example by absorption of the emitted radiation by the analyte [28]. For 0.1 to 10 μM indomethacin the calibration curve was rectilinear: $I = 19.51c - 4.4$ ($r = 0.9991$;

Table 1 – Optimal concentrations of reactants and time sequence of control program for SIA-CL determination of indomethacin

Device	Command	Values	Aspirated solution
SP	Valve position IN		
SP	Set flow rate ($\mu\text{L s}^{-1}$)	100	
SP	Aspirate (μL)	500	
SP	Valve position OUT		
SP	Set flow rate ($\mu\text{L s}^{-1}$)	60	
MPV	Set valve position	1	15 mM Ce(IV) in 50 mM H_2SO_4
SP	Aspirate (μL)	41	
MPV	Set valve position	2	0.5 mM $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$
SP	Aspirate (μL)	30	
MPV	Set valve position	3	0.4 M Na acetate
SP	Aspirate (μL)	16	
MPV	Set valve position	4	Indomethacin in 50% (v/v) ethanol
SP	Aspirate (μL)	15	
MPV	Set valve position	9	
SP	Set flow rate ($\mu\text{L s}^{-1}$)	100	
SP	Empty syringe		
D	On		

SP: syringe pump, MPV: multi-position valve, D: detector.

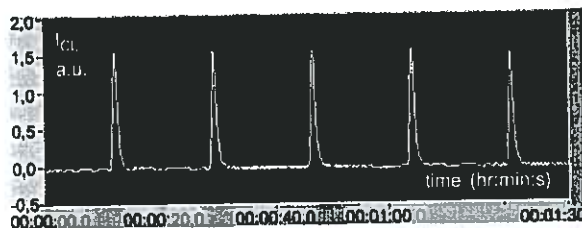


Fig. 5 – SIA-gram of five replicate injections of standard solution of indomethacin 15 μL of 3 μM indomethacin in 50% (v/v) ethanol injected; Reagent zones aspirated: 41 μL of 15 mM Ce(IV) in 50 mM H_2SO_4 , 30 μL of 0.5 mM $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ and 16 μL of 0.4 M Na acetate; $\text{FRa} = 60 \mu\text{L s}^{-1}$; $\text{FRd} = 100 \mu\text{L s}^{-1}$.

$n = 5$). The R.S.D. of the slope of this rectilinear calibration curve was 7.1% when repeating the calibration eight times (in eight different days); the correlation coefficient values ranged between 0.9984 and 0.9998 ($n = 5$). The SIA-gram demonstrating five replicate injections of 3 μM indomethacin is shown in Fig. 5.

The LOD estimated as 3S/N ratio was 50 nmol L^{-1} of indomethacin.

The R.S.D. values of mean peak heights for 10 replicate injections of 0.5 μM and 7 μM indomethacin were 2.40% and 2.02%, respectively, which is the sign of acceptable repeatability.

Maximum sample throughput was 180 h^{-1} .

As for the robustness of the method, the CL signal was not influenced if the optimized concentrations, volumes and flow rates were changed within $\pm 10\%$ except of decreased concentration of Ce(IV); in this case the CL signal diminished by 7% relative to the optimal value if the concentration of Ce(IV) was decreased by 10%.

3.4. Analysis of pharmaceutical formulations

The results of SIA-CL and UV spectrophotometric analysis [17] of indobene gel and Vonum cutan ointment are summarized in Table 2. Comparison of the results obtained by the proposed and reference methods by statistical Student's *t*-test [42] revealed that there is no significant difference between the two methods at 95% confidence level. Thus, the proposed SIA-CL method provides accurate results that are not influenced by the presence of excipients quoted by the manufactures such as 2-propanol, diisopropyl adipate, carbomer 980, trometamol and spruce essential oil for Indobene gel and lauromacrogol,

Table 2 – Determination of indomethacin in semisolid formulations and comparison of results with UV spectrophotometric method

Formulation	Nominal content (%)	Content found (% \pm S.D. ^a)		<i>t</i> -test ^b
		SIA-CL	UV [17]	
Vonum cutan	5	4.80 ± 0.08	4.88 ± 0.08	1.630
Indobene gel	1	1.01 ± 0.04	0.97 ± 0.02	2.003

^a S.D., standard deviation of the mean value ($n = 5$).

^b At 95% confidence level, $n_a = n_b = 5$; $t_{\text{critical}} = 2.228$ [39].

Table 3 – Recoveries of standard additions of indomethacin

Formulation	Indomethacin found by SIA-CL ^a (%)	Indomethacin added (%)	Sum found (%) ^b	Mean recovery (%)	R.S.D. ^c (%)
Indobene gel 1%	1.01	1.00	2.01	99.65	2.50
Vonum cutan 5%	4.80	2.01	6.75	97.31	1.59

^a In original formulation without analyte addition.

^b In original formulation with analyte addition.

^c Relative standard deviation ($n = 3$).

macrogol, glycerol monostearate and cetostearamacrogol for Vonum cutan ointment. This fact is also corroborated by the results of recovery experiments (see Table 3) based on the standard addition technique.

4. Conclusion

Most of available methodologies for indomethacin determination are either time-consuming, need specific and expensive equipment or require a rigorous operator intervention that could affect precision and accuracy. With the sample throughput of 180 injections per hour the devised automated SIA-CL method is by far the fastest method employed for the determination of indomethacin among those published so far. The proposed method is characterised by favourable limit of detection that compares well with that of considerably slower FIA-CL method based on different chemistry [26] which was the only CL one published till now. This was achieved by thorough optimization of the chemical and flow parameters; considerable enhancement of the CL signal was attained by the use of acetate as a novel specific enhancer and by adding ethanol to the analysed indomethacin solutions. Relatively broad calibration range, acceptable reproducibility and selectivity are among main benefits of the method. Since common excipients used in the manufacture of commercial gels and ointments do not interfere with the SIA-CL assay of indomethacin the method could be successfully applied to routine determination of indomethacin in semisolid dosage forms. Its future use in automated studies of the release of indomethacin from pharmaceutical preparations can be envisaged.

Acknowledgements

The authors gratefully appreciate financial support coming from Ministry of Education of Czech Republic, FRVS grant No. 292/2006 and Research Project MSM0021620822 as well as from Charles University Grant Agency GAUK, grant No. 313/2005.

REFERENCES

- [1] Czech drug database, AISLP – Automated information system of pharmaceutical preparations.
- [2] <http://www.healthsquare.com/newrx/ind1209.htm>, visited 25/8/2006.
- [3] British Pharmacopoeia. The Stationery Office, London, 2004.
- [4] M.A. Al Za'abi, G.H. Dehghanzadeh, R.L.G. Norris, B.G. Charles, *J. Chromatogr. B* 830 (2006) 364–367.
- [5] S.-J. Lin, Y.-R. Chen, Y.-H. Su, H.-I. Tseng, S. H. Chen, *J. Chromatogr. B* 830 (2006) 306–313.
- [6] L. Nováková, L. Matysová, L. Havlíková, P. Solich, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 899–905.
- [7] M.Y. Khuhawar, F.M.A. Rind, A.R. Rajper, *Acta Chromatogr.* 15 (2005) 269–275.
- [8] C. Martínez-Algaba, L. Escuder-Gilabert, S. Zahrado, R.M. Villanueva-Camañas, M.J. Medina Hernández, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 393–399.
- [9] S. Liu, M. Kamijo, T. Takayasu, S. Takayama, *J. Chromatogr. B* 767 (2002) 53–60.
- [10] E. Grippa, L. Santini, G. Castellano, M.T. Gatto, M.G. Leone, L. Saso, *J. Chromatogr.* 738 (2000) 17–25.
- [11] C. Cristófol, B. Pérez, M. Pons, J.E. Valladares, G. Martí, M. Arboix, *J. Chromatogr. B* 709 (1998) 310–314.
- [12] J. Sato, T. Amizuka, Y. Niida, M. Umetsu, K. Ito, *J. Chromatogr. B* 692 (1997) 241–244.
- [13] D. Löffler, T.A. Ternes, *J. Chromatogr. A* 1021 (2003) 133–144.
- [14] M.E. Abdel-Hamid, L. Novotný, H. Hamza, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2001) 587–594.
- [15] Y.L. Chen, S.M. Wu, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 907–912.
- [16] K. Makino, T. Yano, T. Maiguma, D. Teshima, T. Sendo, Y. Itoh, R. Oishi, *Ther. Drug. Monit.* 25 (2003) 574–580.
- [17] M. Stolarczyk, J. Krzek, W. Rzeszutko, *J. AOAC Int.* 87 (2004) 592–595.
- [18] T. Aman, F. Naureen, A.A. Kazi, I.U. Ghan, M.A. Kashmiri, *Anal. Lett.* 35 (2002) 1007–1020.
- [19] P.C.A.G. Pinto, M.L.M.F.S. Saraiva, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, *Anal. Chim. Acta* 539 (2005) 173–179.
- [20] P. Solich, H. Sklenářová, J. Huclová, D. Šatinský, U.F. Schaefer, *Anal. Chim. Acta* 499 (2003) 9–16.
- [21] C. Reguera, M.J. Arcos, M.C. Ortiz, *Talanta* 46 (1998) 1493–1505.
- [22] A.M.M. Ali, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18 (1999) 1005–1012.
- [23] G.B. El-Hefnawy, I.S. El-Hallag, E.M. Ghoneim, M.M. Ghoneim, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 220–225.
- [24] C. Reguera, M.C. Ortiz, M.J. Arcos, *Electroanal.* 14 (2002) 1699–1706.
- [25] T. Kitade, K. Kitamura, S. Takegami, R. Yoshinaga, M. Sasakawa, A. Tokuhira, *Anal. Sci.* 18 (2002) 835–838.
- [26] F. Nie, J. Lu, Y. He, J. Du, *Talanta* 66 (2005) 728–733.
- [27] A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens, X. Zhang, F. Alés, L. Gámiz, *Ars Pharmaceutica* 42 (2001) 81–107.
- [28] A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens, *Chemiluminescence in Analytical Chemistry*, Marcel Dekker, Inc., New York, 2001.
- [29] R.D. Gerardi, N.W. Barnett, S.W. Lewis, *Anal. Chim. Acta* 378 (1999) 1–41.
- [30] T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, J. Fenoll, *Anal. Chim. Acta* 485 (2003) 63–72.
- [31] F.A. Aly, S.A. Al-Tamimi, A.A. Alwarthan, *Anal. Sci.* 17 (2001) 1257–1262.

- [32] F.A. Aly, S.A. Al-Tamimi, A.A. Alwarthan, *Talanta* 53 (2001) 885-893.
- [33] N.A. Al-Arfaj, *Talanta* 62 (2004) 255-263.
- [34] N.A.A. Alarfaj, *Anal. Sci.* 19 (2003) 1145-1149.
- [35] D.R. Skotty, T.A. Nieman, *J. Chromatogr. B* 665 (1995) 27-36.
- [36] K. Uchikura, M. Kirisawa, *Chem. Lett.* 20 (1991) 1373-1376.
- [37] N. Anastos, N.W. Barnett, S.W. Lewis, N. Gathergood, P.J. Scammells, D.N. Sims, *Talanta* 67 (2005) 354-359.
- [38] P. Solich, M. Polášek, J. Klimundová, J. Ruzicka, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 116-126.
- [39] C.E. Lenehan, N.W. Barnett, S.W. Lewis, *Analyst* 127 (2002) 997-1020.
- [40] J. Xi, B. Shi, X. Ai, Z. He, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 237-241.
- [41] S. Lakshmi, R. Renganathan, *Int. J. Chem. Kinet.* 28 (1996) 713-720.
- [42] K. Eckschlager, I. Horsak, Z. Kodejs, *Vyhodnocovani analytickych vysledku a metod (Evaluation of Analytical Results and Methods)*, SNTL, Prague, 1980, p. 34.

5.5 Příloha 5: K. Mervartová, M. Polášek, D. Lopez, J. Martínez Calatayud, **Rapid automated chemiluminescence determination of verapamil by sequential injection analysis (SIA) using tris[(2,2'-bipyridyl)]ruthenium(III) complex as reagent and its application to analysis of tablets, připraveno k publikaci**

Rapid automated chemiluminescence determination of verapamil by sequential injection analysis (SIA) using tris[(2,2'-bipyridyl)]ruthenium(III) complex as reagent and its application to analysis of tablets

Kateřina Mervartová^a, Miroslav Polášek^a, Daniel Lopez^b, José Martínez Calatayud^b
^aDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, CZ-500 05 Hradec Králové, Czech Republic
^bDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Valencia, Spain

Abstract

Method for automated sequential injection analysis (SIA) – chemiluminescence (CL) determination of calcium channel blocker verapamil (**I**) using a lab-made PC-controlled SIA analyzer equipped with modified fluorescence detector was devised. The CL reaction was based on interaction of **I** with unstable tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(III) complex ($\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$) at pH 5.4 (acetate buffer). The $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$ intermediate was generated in situ in the SIA system by the oxidation of stable tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) complex ($\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$) with Ce(IV) in sulphuric acid. Optimal aspirated volumes and concentrations of the reactants were: 69 μl of 7.5 mM Ce(IV) in 75 mM sulphuric acid, 25 μl of 1 mM $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$, 13 μl of 0.2 M acetate buffer of pH 5.4 and 15 μl of the sample of **I** in 50% (v/v) methanol; the flow rates were 50 $\mu\text{L s}^{-1}$ for the aspiration into the holding coil and 100 $\mu\text{L s}^{-1}$ for detection. Calibration curve relating the intensity of CL (peak height of the transient CL signal) to concentration of **I** was linear for 0.01 - 20 $\mu\text{M I}$ ($r = 0.9997$; $n = 12$). The limit of detection (3σ) was 10 nM **I** and the sample throughput was 180 h^{-1} . The method was used for determining the content of **I** in Isoptin 40 mg tablets; the SIA-CL results did not show statistically significant difference from those of the official spectrophotometric method.

Keywords: verapamil, sequential injection analysis, chemiluminescence, ruthenium, pharmaceuticals, calcium channel blocker

Introduction

Verapamil 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5-[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl-methyl-amino]-2-(1-methyl)pentanenitrile; for chemical structure see Fig. 1) is a phenylalkylamine-type calcium channel blocker. It restricts intake of calcium to smooth muscle cells, to myocytes and also to cells of heart conductive system. Therefore vasodilatation is induced (mainly of coronary vessels) and heart excitement is reduced. Due to its effect verapamil is indicated in the treatment of heart ischemic disease (angina pectoris), cardiac arrhythmia and as active substance in extended-release formulations in the treatment of hypertension [1].

Since verapamil is widely used in human therapy an attention has been focused on the development of various analytical methods for its determination in different matrices of pharmaceutical or biomedical interest in the recent decade and among those published so far HPLC [2-14] predominates. Most of the HPLC papers deal with the separation of verapamil from its main metabolite norverapamil or from other related substances. As a result of its chirality verapamil exists as racemic mixture of the R- and S- enantiomers that could be separated by capillary electrophoresis (CE) [15] or by liquid chromatography [16-18]. In the aforementioned separation methods UV spectrophotometric [2-6], fluorescence [3, 7-12, 17] and mass spectrometric [13, 14, 18] detection were employed. Verapamil was also determined by batch methods such as spectrophotometry at 415 nm using N-bromosuccinimide as reagent [19], spectrofluorimetry [20], indirect atomic emission spectrometry [21], and adsorptive stripping voltammetry (ASV) [22]. The technique of flow-injection analysis (FIA) with amperometric detection was used for the assay of verapamil in tablets and urine [23]. The highest sensitivity was achieved with mass spectrometric detection (limit of quantification (LOQ) = 1 nmol L⁻¹ of verapamil) [13] and in the ASV method (limit of detection (LOD) = 1 nmol L⁻¹ of verapamil) [22]. For HPLC with fluorescence detection the LOD or LOQ values of ≈ 10 nmol L⁻¹ were attained [3, 8-12].

Chemiluminescence (CL) arises as emitted light (photons) during some chemical (usually redox) reactions. Most common CL reactions involve luminol, lucigenin, lophine, peroxyoxalate, sulphite, permanganate, Ce(IV) and ruthenium(III) complexes as reagents [24, 25]. Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(III) complex (Ru(bipy)₃³⁺) [26] can oxidize some organic analytes (such as, e.g., oxalate or particular amines) to form excited [Ru(bipy)₃²⁺]* species that relaxes to ground state while emitting orange light (maximum emission at 610 nm) [26]. The Ru(bipy)₃³⁺ is rather unstable molecule that needs to be generated in situ from relatively more stable Ru(bipy)₃²⁺ complex by chemical, photochemical or electrochemical oxidation. In recent years chemical oxidation of Ru(bipy)₃²⁺ to Ru(bipy)₃³⁺ was carried out for example with Ce(IV) [27-29] or with permanganate [30, 31] in acidic medium. Many important drugs contain nitrogen atoms in their molecules; hence the Ru(bipy)₃³⁺ has high potential to become useful reagent for their CL determination under specific optimized conditions. To our best knowledge no CL method for the assay of verapamil has been published so far.

Automated flow techniques such as sequential injection analysis (SIA) proved to be efficient tool for solving practical problems occurring in the field of pharmaceutical analysis [32, 33]. One of the assets of SIA is feasibility of on-line preparation of unstable reagents directly in the SIA manifold. Substantial reduction of waste generation as well as minimizing the consumption of sample and reagents is also an important feature of SIA. In our preliminary experiments we found that verapamil gives rise to CL radiation in the reaction with Ru(bipy)₃³⁺ generated via chemical oxidation of Ru(bipy)₃²⁺ by Ce(IV) directly in the SIA system. The present work is dealing with the development and validation of automated rapid and sensitive SIA-CL method suitable

for the assay of verapamil in tablets involving evaluation of its accuracy by comparison with reference pharmacopoeial spectrophotometric method [34].

Experimental

Apparatus

The SIA system (see Fig. 2) was built from CAVRO XL 3000 piston pump (volume 2.5 mL Cavro Scientific Instruments Inc., USA), Vici Valco ten-port selection valve with electrical actuator (Valco Instruments Co., Inc., USA), model FS 970 Schoeffel Instruments Corp. (USA) fluorimetric flow detector (UV lamp switched off) equipped with a lab-made CL module with spiral geometry; the photomultiplier tube voltage was 300 V. The SIA system comprised manifold with a holding coil made of PTFE tubing (length 70 cm, i.d. 0.75 mm, volume 1.2 mL). The same tubing was spirally coiled on a 52 mm × 52 mm Perspex plate that replaced the secondary filter positioned in front of the photomultiplier window in the flow detector; this CL module had a central inlet, peripheral outlet and the diameter of the spiral was 24 mm. The control unit consisted of Pentium 75 MHz PC equipped with additional AT-MIO-16E10 data acquisition and AT-232/4 interface cards (National Instruments Corporation, USA). The whole system was operated by software (FaFSIA, Version 1.2); advanced data processing and was performed by LPMcalc, Version 1.0 (lab-made programs written in LabVIEW). The optimization calculations were carried out by our own SIMPLEX MS DOS software. The UV-spectrophotometric measurements were performed on Hewlett-Packard HP 8453 photodiode array spectrophotometer. The CL emission spectra were measured by Perkin-Elmer LS 50B luminescence spectrometer.

Reagents

All solutions were prepared from analytical grade chemicals and a Millipore Milli-Q RG ultra pure water. Standard of verapamil hydrochloride, tris(2,2'-bipyridyl)dichlororuthenium(II) hexahydrate, acetonitrile, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), sodium dodecylsulphate (SDS), triton X-100 and methanol were purchased from Sigma Aldrich (Germany). Cerium(IV) ammonium sulphate, quinine, fluorescein, potassium hydrogen phthalate and succinic acid were purchased from Fluka (Switzerland). Rhodamin B, potassium dihydrogen phosphate and sodium hydrogen phosphate were from Merck (Germany). Acetone, sulphuric acid, sodium hydroxide, acetic acid, formic acid, sodium acetate, phosphoric acid, ethanol, hydrochloric acid and boric acid were obtained from Lachema (Czech Republic).

Stock solution of 0.4 mM verapamil was prepared by dissolving appropriate amount of the substance in water. Working solutions were obtained by dilution of the stock solution with water or with aqueous-organic solvents.

Isoptin tablets (Abbott GmbH, Germany) containing 40 mg of verapamil and unspecified amounts of calcium hydrogenphosphate, magnesium stearate, sodium dodecylsulphate, colloidal silica, talc, titanium dioxide, microcrystalline cellulose, macrogol 6000, carmellose sodium and hypromellose 2910 as excipients were analyzed.

SIA procedure

Appropriate volumes of verapamil test solution or blank, solution of $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$, buffer and Ce(IV) in sulphuric acid were automatically aspirated in optimum order into the holding coil, the zones were mixed by flow reversal and the arising CL product was pushed into the detector cell. The transient CL signal was recorded in the form of peaks and processed by our original software written in LabVIEW (involving the peak height calculations in nA). Each measuring cycle was carried out four times at ambient

temperature and the mean values of the peak heights and their standard deviations were computed automatically. The net CL signal was calculated by subtracting the mean blank signal from the mean raw signal value where appropriate.

A schematic view of the employed SIA manifold is shown in Fig. 2.

Optimisation

Results of preliminary experiments indicated that the optimum order of the reactant zones aspirated into the holding coil was: (i) Ce(IV) sulphate in sulphuric acid, (ii) aqueous $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$, (iii) buffer solution, and (iv) test solution of verapamil. This order was applied in all subsequent experiments.

Chemical parameters

Initially the effect of the concentration of the individual reactants on the net CL response of 15 μL of 0.4 μM verapamil in aqueous 50% (v/v) ethanol was examined by the univariate technique (the concentration of the reactant examined was changed while the other concentrations were fixed). Flow rate of aspirating the zones of the reactants into the holding coil (FRa) was 25 $\mu\text{L s}^{-1}$ and the flow rate of aspirating the zone of emitting species into the detector (FRd) was 100 $\mu\text{L s}^{-1}$.

The aspirated volume of the Ce(IV) sulphate in sulphuric acid zone was 70 μL and the concentrations were varied in the range 0.1 to 10 mM Ce(IV) and 10 to 100 mM H_2SO_4 . The aspirated volume of the $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ zone was 30 μL and the concentration of $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ changed in the range 0.1 to 10 mM. The volume of the aspirated buffer solution was 30 μL .

The effect of the content of 0.5 – 30% (v/v) of acetone, 5 – 30% (v/v) of acetonitrile, 25 – 75% (v/v) of methanol and 50% (v/v) of ethanol in the injected 0.4 μM verapamil on the net CL intensity was tested at optimized Ce(IV), sulphuric acid, $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ and acetate buffer. In addition possible enhancement of the CL intensity by selected surfactants and sensitizers was examined by treating the injected 0.4 μM verapamil solution in 50% (v/v) methanol with appropriate surfactant or sensitizer to contain 0.02 to 0.21% of Triton X-100, 5 to 80 mM sodium dodecylsulphate, 1 to 10 mM cetyltrimethylammonium bromide, quinine 1 mM, fluorescein 0.2 and 2 mM, formic acid 5 % or Rhodamin B 0.5 mM.

5 buffers were examined, namely 0.2 M acetate buffer pH 4.0-5.6, 0.067 M phosphate buffer pH 5.6-8.0, Britton-Robinson buffer pH 2.0-11.0, 0.2 M succinate buffer pH 3.8-6.0 and 0.1 M phthalate buffer pH 4.0-6.0. The buffers were critically compared. The influence of phosphate was further examined by adding of small amount of phosphate to acetate buffer.

Optimization of flow parameters

With optimized concentrations of the reactants the volumes of the reagents and the flow rates were optimized. Flow rates FRa and FRd were optimised separately whereas the volumes simultaneously by the multi-variate computer-aided SIMPLEX method using an MS DOS software devised in our laboratory. The sample was 15 μL of 0.4 μM verapamil in 50% (v/v) methanol; its volume was maintained constant during the whole SIMPLEX process. The process was initiated with 70 μL of 7.5 mmol L^{-1} Ce(IV) in 75 mmol L^{-1} H_2SO_4 , 30 μL of 1 mmol L^{-1} $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ and 30 μL of 0.2 M acetate buffer pH 5.4. The initial flow rates were FRa 25 $\mu\text{L s}^{-1}$ and FRd 100 $\mu\text{L s}^{-1}$. The lower and upper limits of FRa and FRd were 1 $\mu\text{L s}^{-1}$ and 100 $\mu\text{L s}^{-1}$ and the aspirated volumes of the reagent zones were optimized within the range 1 μL to 100 μL .

Calibration curve, LOD, repeatability, interferences

Calibration was performed under the optimum conditions with 12 standard solutions of verapamil covering the concentration range 0.01 to 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$. For each standard solution five replicate injections were carried out. The calibration data were evaluated by linear regression analysis.

The LOD was calculated by the 3S/N method as the concentration of verapamil giving rise to CL signal exceeding three times the standard deviation of the blank signal.

The repeatability of the CL peak heights was estimated by performing 10 replicate injections of three standard solutions containing 0.4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of verapamil; the relative standard deviation (RSD) of the mean peak height was calculated for either concentration of verapamil.

Common excipients as sodium dodecylsulphate, saccharose, methylcellulose, lactose and glucose used in tablets were added to the standard solution of 4 10^{-7} M verapamil in 50% (v/v) methanol. Net signals were compared with signal of that verapamil solution without excipient.

Analysis of pharmaceutical formulation

Procedure for the assay of verapamil tablets by the SIA-CL method

The commercially available dosage form of verapamil - Isoptin 40mg was analysed. 10 tablets were weighted, crushed and homogenized. The amount of one tablet (corresponding to 40 mg of verapamil) was quantitatively put into 100 mL volumetric flask containing 80 mL of water and the suspension was sonicated for 15 min. Thereafter the volume was adjusted to 100 mL with water and the suspension was filtered through a membrane filter (Nylon syringe filter pore size 0.45 μm). A 0.5-mL portion of the filtrate was diluted with 50 % (v/v) methanol to 50 mL in a volumetric flask; this test solution was directly analysed by the proposed SIA-CL method under the optimum conditions with use of calibration curve covering the range 1 to 10 μM verapamil. Five samples were analysed and for each test solution five replicate injections were carried out. The same concentration was prepared with standard of verapamil and both signals (heights of the peaks) were compared.

Procedure for the UV spectrophotometric assay of verapamil [34]

The UV spectrophotometric measurement of verapamil was carried out according to British Pharmacopoeia 2004 (34). 20 tablets were weighted and powdered. An amount of 100 mg of verapamil (2.5 tablets) were shaken with 150 mL of 0.1 M HCl for 10 min and afterwards it was filled to 200 mL and filtered. 10 mL of the filtrate was diluted to 100 mL with water and the absorbance of this solution was measured at 278 nm in a 1-cm fused silica cell. The A(1%, 1 cm) is 118. Blank solution was prepared in the same way without verapamil. Five samples were measured.

Accuracy

The accuracy of the proposed SIA-CL method was evaluated by the statistical Student's t-test [35]. Such a test involved comparison of the results of verapamil determination in Isoptin 40 mg as found by the SIA-CL method and by the UV spectrophotometry [34].

Results and discussion

Optimization of chemical parameters

The CL determination of verapamil has not been described in the literature till now. In preliminary tests the promising response of relatively low concentration of verapamil was recorded when oxidized by unstable buffered $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$. It was decided to employ relatively stable $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ as the reagent in combination with the SIA technique for automated in-situ formation of $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$ and its on-line CL reaction with verapamil. The common oxidant of $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ is Ce(IV) in sulphuric acid. It was found that the only sequence of reactant zones aspirated into the holding coil leading to CL emission is Ce(IV) in sulphuric acid - $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ - acetate buffer - verapamil. The orange light emitted showed maximum emission at 590 - 610 nm; this fact indicates that the emitting species is excited $[\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}]^*$ [26].

Sulphuric acid forms complexes with Ce(IV); it has been already pointed out that the reactive species of Ce(IV) are $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ and $\text{H}[\text{Ce}(\text{SO}_4)_3]^-$ [36, 37] and hence the concentration of sulphuric acid should influence the reactivity of Ce(IV) with $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$. On the other hand extremely high acidity of the Ce(IV) reagent could cause decomposition of the $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ complex. It was found that the intensity of CL increases when decreasing concentration of H_2SO_4 down to 0.075 mol L^{-1} but further decrease of its concentration results in the formation of precipitate in the flow system; therefore $75 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ was selected as the optimum parameter. The intensity of CL increased when increasing concentration of Ce(IV) from 0.1 to 7.5 mmol L^{-1} and then it slightly decreased for 10 mmol L^{-1} Ce(IV); hence the optimal concentration of Ce(IV) was set to 7.5 mmol L^{-1} . Solutions of $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ prepared in water or in 0.05 M sulphuric acid were compared. Better response was obtained with $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ dissolved in water, concentration dependence is depicted in figure 3; it can be seen that maximum CL response was attained for $1 \text{ mM Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$.

Not buffered reaction gave weak CL response. Phosphate buffer, Britton-Robinson buffer over wide examined pH ranges decrease the CL response in contrast to acetate, succinate and phthalate buffers whose relations between pH and CL response is presented in Fig. 4. The most suitable buffer and its pH was acetate pH 5.4. Acetic acid is one part of Britton-Robinson buffer, however, reaction with this buffer is diminished. Sodium hydrogenphosphate which is ingredient of Britton-Robinson buffer, too, was added to acetate buffer pH 5.4 ($0.033 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$) to find effect on CL response. The decrease of CL response was almost 10 times when Na_2HPO_4 was added. Apparently the presence of acetate is essential for the formation of the CL emitting species.

Addition of organic solvents often increases CL response due to its sensitising effect. Therefore stock solution as well as the working and standard solutions were prepared in organic or mixed aqueous-organic media. It can be concluded that methanol exhibits the best sensitizing effect and that its optimum content in the injected sample is 50%.

The sensitizers mentioned in Experimental section did not show any improvement of the method towards better signals. The examined surfactants (see Experimental section), except for 10 mM cetyltrimethylammonium bromide and 5 mM sodium dodecylsulphate, did not influence significantly the intensity of CL. This anionic and cationic surfactant increased the signal doubly. The improvement of the detection limit is possible with these surfactants. Due to application of our method which is proposed for determination of verapamil in tablets where low concentrations of verapamil aren't expected, no surfactant was further employed.

To recapitulate, the optimum concentrations of the reactants in the aspirated zones were 7.5 mmol L^{-1} Ce(IV) in $75 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$, $1 \text{ mM Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$, 0.2 M

acetate buffer pH 5.4 and 50% (v/v) of methanol in the injected test solution of verapamil.

Optimization of flow parameters

Flow rates FRa and FRd were optimized separately. FRa $50 \mu\text{L s}^{-1}$ and FRd $100 \mu\text{L s}^{-1}$ were optimal. Twenty six SIMPLEX vertexes were run to optimize the volumes of the aspirated zones of the reactants (except for the zone of $0.4 \mu\text{M}$ verapamil with fixed volume of $15 \mu\text{L}$ in terms of achieving maximum intensity of CL).

After twenty three vertexes the CL intensity did not improve with further runs. Hence the final optimum conditions found with the 23rd vertex were $69 \mu\text{L}$ of 7.5 mmol L^{-1} Ce(IV) in 75 mmol L^{-1} H_2SO_4 , $25 \mu\text{L}$ of 1 mmol L^{-1} $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$, $13 \mu\text{L}$ of 0.2 M acetate buffer pH 5.4. The optimum time sequence of the SIA control programme is summarized in Table 1.

Calibration curve, LOD, repeatability, interferences

The best curve fit of the calibration data covering the examined concentration range of $0.01 - 20 \mu\text{mol L}^{-1}$ verapamil (12 concentrations) was rectilinear $I = 28.77c - 3.76$ ($r = 0.9997$; $n = 12$) where I stands for the mean peak height (CL intensity in nA) and c is concentration of verapamil (μM).

The LOD estimated as $3S/N$ ratio was 10 nmol L^{-1} of verapamil.

The RSD values of mean peak heights for 10 replicate injections of $0.4 \mu\text{M}$, $2 \mu\text{M}$ and $10 \mu\text{M}$ verapamil were 1.74 %, 1.93 % and 1.54 % respectively.

Maximum sample throughput was 180 h^{-1} .

The common excipients in tablets as possible interferences are summarised in table 2. None of the tested substances interfered with the proposed method.

Analysis of pharmaceutical formulations

The results of SIA-CL and UV spectrophotometric analysis [34] of Isoptin 40 mg are summarized in Table 3. Comparison of the results obtained by the proposed and reference methods by statistical Student's t-test [35] revealed that there is no significant difference between the two methods at 95% confidence level. Thus the proposed SIA-CL method provides accurate results that are not influenced by the presence of excipients quoted by the manufactures such as calcium hydrogen phosphate dehydrate, sodium carmellose sodium, silica colloidal, macrogol 6000, magnesium stearate, hypromellose 2910, cellulose microcrystalline, sodium lauryl sulphate, talcum, titanium dioxide.

Conclusion

Most of available methodologies for verapamil determination are either time-consuming, need specific and expensive equipment or require a rigorous operator intervention that could affect precision and accuracy. With the sample throughput of 180 injections per hour the devised automated SIA-CL method is by far the fastest method employed for the determination of verapamil among those published so far. Relatively broad calibration range, acceptable reproducibility and selectivity are among main benefits of the method. Since common excipients used in the manufacture of commercial dosage form do not interfere with the SIA-CL assay of verapamil the method could be successfully applied to routine determination of verapamil in tablets.

Acknowledgements

The authors gratefully appreciate financial support coming from Charles University Grant Agency GAUK, grant No. 85107-B/2007 and from Research Project MSM0021620822.

References

1. Czech drug database, AISLP – Automatizovaný informační systém léčivých přípravků
2. M. V. S. Varma, M. Sarkar, N. Kapoor, R. Panchagnula, *J. Chromatogr. B* 816 (2005) 243-249
3. Y. Özkan, N. Yılmaz, S. A. Özkan, I. Biryol, *Il Farmaco* 55 (2000) 376-382
4. M. A. García, C. Soláns, J. J. Aramayona, L. J. Fraile, M. A. Brigante, J. R. Castillo, *Talanta* 47 (1998) 1245-1254
5. K. Hanada, S. Akimoto, K. Mitsui, M. Hashiguchi, H. Ogata, *J. Chromatogr. B* 710 (1998) 129-135
6. M. A. Garcia, J. J. Aramayona, M. A. Bregante, L. J. Fraile, C. Solans, *J. Chromatogr. B* 693 (1997) 377-382
7. O.H. Jhee, J.W. Hong, A.S. Om, M.H. Lee, W.S. Lee, L.M. Shaw, J.-W. Lee, J.S. Kang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 405-410
8. Wiesław Sawicki, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 689-695
9. E. Brandšteterová and I. W. Wagner, *J. Chromatogr. B* 732 (1999) 395-404
10. E. B. Asafu-Adjaye, G. K. Shiu, *J. Chromatogr. B* 707 (1998) 161-167
11. A. Ceccato, P. Chiap, Ph. Hubert, B. Toussaint, J. Crommen, *J. Chromatogr. A* 750 (1996) 351-360
12. G. Stagni, W. R. Gillespie, *J. Chromatogr. B* 667 (1995) 349-354
13. O. von Richter, M. Eichelbaum, F. Schönberger, U. Hofmann, *J. Chromatogr. B* 738 (2000) 137-147
14. T. Alebic-Kolbah, A. P. Zavitsanos, *J. Chromatogr. A* 759 (1997) 65-77
15. J.-M. Dethy, S. D. Broux, M. Lesne, J. Longstreth, P. Gilbert, *J. Chromatogr. B* 654 (1994) 121-127
16. L. Valvo, R. Alimenti, S. Alimonti, S. Raimondi, F. Foglietta, F. Campana, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 989-996
17. M. Rambla-Alegre, M. T. Gil-Agustí, M. E. Capella-Peiró, S. Carda-Broch, J. S. Esteve-Romero, *J. Chromatogr. B* 839 (2006) 89-94
18. N. C. do C. Borges, G. D. Mendes, R. E. Barrientos-Astigarraga, P. Galvinos, C. H. Oliveira, G. De Nucci, *J. Chromatogr. B* 827 (2005) 165-172
19. N. Rahman, S. N. Hejaz Azmi, *Il Farmaco* 59 (2004) 529-536
20. J. C. G. Esteves da Silva, J. M. M. Leitão, F. S. Costa, J. L. A. Ribeiro, *Anal. Chim. Acta* 453 (2002) 105-115
21. S. Khalil, A. Kelzieh, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 123-131
22. E. A. Kasim, M. A. Ghandour, M. T. El-Haty, M. M. Ahmed, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 921-929
23. J.A. Ortuño, C. Sánchez-Pedreño, A. Gil, *Anal. Chim. Acta* 554 (2005) 172-176
24. A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens, X Zhang, F. Alés, L. Gámiz, *Ars Pharmaceutica* 42 (2001) 81-107
25. A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens, *Chemiluminescence in analytical chemistry*, Marcel Dekker, Inc., New York, 2001
26. R. D. Gerardi, N. W. Barnett, S. W. Lewis, *Anal. Chim. Acta* 378 (1999) 1-41

27. T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, J. Fenoll, *Anal. Chim. Acta* 485 (2003) 63-72
28. F.A. Aly, S.A. Al-Tamimi, A.A. Alwarthan, *Anal. Sci.* 17 (2001) 1257-1262
29. F.A. Aly, S.A. Al-Tamimi, A.A. Alwarthan, *Talanta* 53 (2001) 885-893
30. N.A. Al-Arfaj, *Talanta* 62 (2004) 255-263
31. N.A.A. Alarfaj, *Anal. Sci.* 19 (2003) 1145-1149
32. P. Solich, M. Polášek, J. Klimundová, J. Ruzicka, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 116-126
33. C. E. Lenehan, N. W. Barnett, S. W. Lewis, *Analyst* 127 (2002) 997-1020
34. *British Pharmacopoeia*, 2004, The Stationery Office, London, 2004, p. 2799
35. K. Eckschlager, I. Horsak, Z. Kodejs, *Vyhodnocovani analytickych vysledku a metod (Evaluation of Analytical Results and Methods)*, SNTL, Prague, 1980, p. 34
36. J. Xi, B. Shi, X. Ai, Z. He, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 237-241
37. Lakshmi, R. Renganathan, *In. J. Chem. Kinet.* 28 (1996) 713-720

Figure 1. Structural formula of verapamil

Figure 2. Schematic view of SIA manifold

CS: carrier stream, SP: syringe pump, HC: holding coil, MSV: multi-position selection valve, D: detector, W: waste, R₁: Ce(IV) in sulphuric acid, R₂: Ru(bipy)₃²⁺ complex, R₃: buffer,

S: verapamil sample in 50% methanol

Figure 3. Dependence of the intensity of CL on the concentration of Ru(bipy)₃²⁺ complex

15 µL of 0.1 µM verapamil in 50% (v/v) ethanol injected;

Reagent zones aspirated: 70 µL of 7.5 mM Ce(IV) in 75 mM H₂SO₄, 30 µL of Ru(bipy)₃²⁺, 30 µL of 0.2M acetate buffer pH 5.4; FRa = 25 µL s⁻¹; FRd = 100 µL s⁻¹

Figure 4.

Examination of 3 buffers – A acetate, S succinate and P phthalate buffer.

15 µL of 0.1 µM verapamil in 50% (v/v) ethanol injected;

Reagent zones aspirated: 69 µL of 7.5 mM Ce(IV) in 75 mM H₂SO₄, 25 µL of 1 mM Ru(bipy)₃²⁺, 13 µL of buffer; FRa = 50 µL s⁻¹; FRd = 100 µL s⁻¹

Table 1. Optimal concentrations of reactants and time sequence of control program for SIA-CL determination of verapamil

SP: syringe pump, MPV: multi-position valve, D: detector

Table 2. Mean recovery value ± standard deviation for determination of 4 · 10⁻⁷ M verapamil in the presence of common excipients

Table 3. Determination of verapamil in tablets and comparison of results with UV spectrophotometric method [34]

^a SD, standard deviation of the mean value (n=5)

^b At 95% confidence level; , n_A = n_B = 5, t_{critical} = 2.31 [35]

Figure 1.

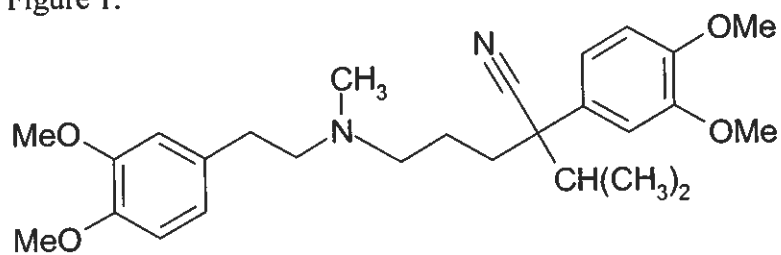


Figure 2.

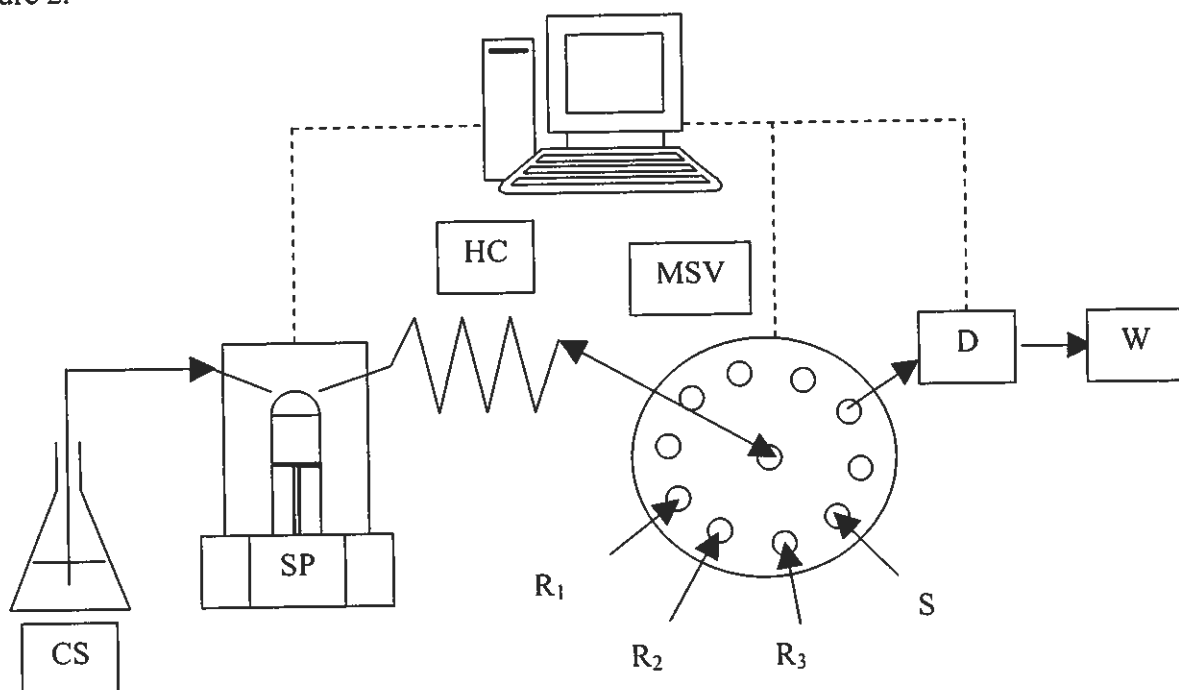


Figure 3.

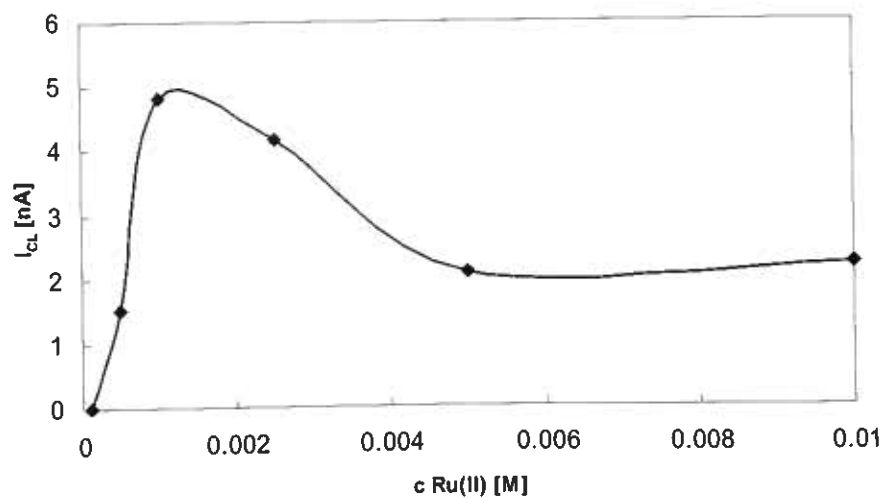


Figure 4.

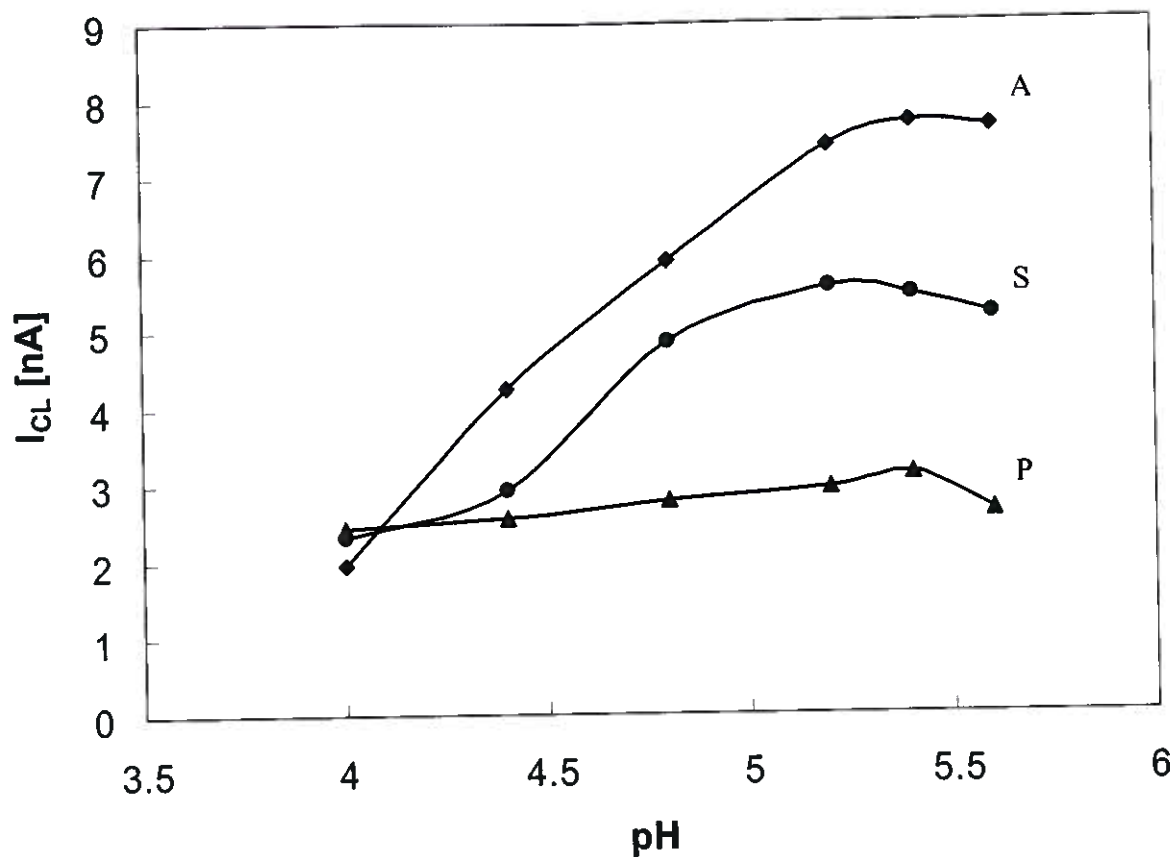


Table 1.

Device	Command	Values	Aspirated solution
SP	valve position IN		
SP	set flow rate [$\mu\text{l/s}$]	100	
SP	aspirate [μl]	500	
SP	valve position OUT		
SP	set flow rate [$\mu\text{l/s}$]	50	
MPV	set valve position	1	7.5 mM Ce(IV) in 75 mM H ₂ SO ₄
SP	aspirate [μl]	69	
MPV	set valve position	2	1 mM Ru(bipy) ₃ ²⁺
SP	aspirate [μl]	25	
MPV	set valve position	3	acetate buffer pH 5.4
SP	aspirate [μl]	13	
MPV	set valve position	4	verapamil in 50% (v/v) methanol
SP	aspirate [μl]	15	
MPV	set valve position	9	
SP	set flow rate [$\mu\text{l/s}$]	100	
SP	empty syringe		
D	on		

Table 2.

Excipient	Weight ratio (excipient:verapamil)	Recovery \pm SD (%) ($n=5$)
Sodium laurylsulphate	1:500	100.16 \pm 2.97
Saccharose	1:500	96.30 \pm 2.92
Methylcellulose	1:250	102.28 \pm 3.49
Lactose	1:250	97.04 \pm 2.10
Glucose	1:125	98.36 \pm 2.94

Table 3.

Formulation	Nominal content	Content found (% \pm SD ^a)		<i>t</i> -test ^b
		SIA-CL	UV [17]	
Isoptin 40 mg	40 mg	38.26 \pm 0.08	38.48 \pm 0.09	0.407

5.6 *Příloha 6: K. Mervartová, M. Polášek, **Effect of organic solvents on chemiluminescence reactions**, připraveno k publikaci*

Effect of organic solvents on chemiluminescence reactions

Kateřina Mervartová*, Miroslav Polášek

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hřevovského 1203, CZ-500 05 Hradec Králové, Czech Republic

*Corresponding author. Tel.: +420 495067391; fax: +420 495067164

E-mail address: Katerina.Mervartova@faf.cuni.cz (K. Mervartová)

Abstract

This project deals with an investigation of possible sensitization effect on chemiluminescence (CL) reactions (involving permanganate or tris[(2,2'-bipyridyl)]ruthenium(III) as CL reagents) by solvents that comprise mainly alcoholic group in their molecule. This study was carried out via sequential injection analysis.

The effect of solvents on three CL systems was examined: oxidation of drug endralazine (i) or verapamil (ii) by permanganate in sulfuric acid in the presence of hexametaphosphate, oxidation of drug verapamil (iii) by tris[(2,2'-bipyridyl)]ruthenium(III) generated on-line from tris[(2,2'-bipyridyl)]ruthenium(II) by Ce(IV) in sulphuric acid. The solvents were primary alcohols (methanol, ethanol, 1-propanol and 1-butanol, 2-methyl-1-propanol), secondary alcohols (2-propanol and 2-butanol), tertiary alcohol (2-methyl-2-propanol), diols (1,2-ethanediol, 1,2-propanediol, 1,3-propanediol, 1,2-butanediol, 1,3-butanediol, 2,3-butanediol and 1,4-butanediol), polyols (glycerol and poly(vinylalcohol)) and other compounds with non-alcoholic miscellaneous structures (acetone, acetonitrile, dimethylsulfoxide and dimethylformamide) serving as dissolution medium for the analyte.

All solvents were tested as mixtures with water containing typically 0 to 100% of the organic component. Considerable enhancing effect was achieved with all solvents in the reaction with ruthenium complex, the enhancing effect was up to 4.6 times related to purely aqueous medium. Methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol, 1,2-ethanediol, glycerol, 1,2-propanediol, 1-butanol, 2-methyl-1-propanol, 2-butanol, 1,3-propanediol, 1,2-butanediol, 1,3-butanediol and 2,3 butanediol sensitized the reaction with permanganate, the enhancing effect was up to 125 times. Calibration relation of tested drugs in certain concentration of promising solvents was further studied.

Keywords: solvents, chemiluminescence, SIA, verapamil, endralazine

Introduction

Some solvents as methanol [1, 2], ethanol [3, 4], 2-propanol [5] and less often acetonitrile [2], acetone [2] or dimethylformamide [3] have been used in chemiluminescence (CL) reaction with potassium permanganate or CL reaction based on less stable ruthenium complex tris[(2,2'-bipyridyl)]ruthenium(III) ($\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$). This use of the solvents in the CL system has had many reasons e.g. dissolution of hardly soluble samples in water [6], organic component of mobile phase in reverse liquid chromatography [1, 7-12] or a sensitization effect on the CL signal [3, 13]. The last named phenomenon opens question if also other solvents related to previously fairly used solvents have any influence on the CL reactions and if the use of them is profitable in the CL methods.

Chemiluminescence (CL) [14], belonging to luminescence techniques similarly as fluorescence, arises as emitted light (photons) during chemical (usually redox) reaction. Although the capacity for fluorescence is primarily a function of molecular structure, the solvent of a potentially fluorescing molecule can have a dramatic effect on the fluorescence. Solvent interactions with solute molecules are mainly electrostatic and it is usually the differences between the electrostatic stabilization energies of ground and excited states that contribute to the relative intensities and spectral positions of fluorescence in different solvents [14].

The most common CL reactions involve luminol, lucigenin, lophine peroxyoxalate, sulphite, permanganate, Ce(IV) and ruthenium(III) complexes as reagents [15]. The CL reactions with permanganate and ruthenium complex are object of this project. The analyte is directly oxidized by these reagents and the excess of energy is emitted as light. Hexametaphosphate can sensitize CL reaction of permanganate [16]. The tris[(2,2'-bipyridyl)]ruthenium(III) [17] is less stable oxidant which can be easily prepared in situ by oxidation of stable form tris[(2,2'-bipyridyl)]ruthenium(II) ($\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$). When sequential injection analysis is used, the whole generation process can be accomplished online in one step with the determination of the sample. This ruthenium reaction proceeds under desirable pH which is usually maintained by acetate buffer [17] or phosphate buffer [18]. The advantages of the CL methods lie in proposals of sensitive methods with wide linear calibration range and the instrument represents a simple, robust and cost-effective apparatus.

The whole project was investigated in sequential injection analysis (SIA) [19] which is based on aspiration of zones into the tube and reversing stream in direction to the detector where the CL signal of arising CL reaction is monitored. The characteristic features of SIA are the ability of automation, efficient and reproducible mixing of small volumes of sample and reagents. If the mixing takes place as close as possible to the photodetector window, even fast CL reactions can be recorded. Since the timing of the mixing process is fully reproducible it is unnecessary to measure the whole CL emission profile. Therefore with the development of these flow methods (besides newer SIA there is older and more utilized flow injection analysis – FIA) the use of fast and reproducible chemiluminescence detection became considerably attractive.

The tested solvents can be divided to primary alcohols (methanol, ethanol, 1-propanol and 1-butanol, 2-methyl-1-propanol), secondary alcohols (2-propanol and 2-butanol), tertiary alcohol (2-methyl-2-propanol), diols (1,2-ethanediol, 1,2-propanediol, 1,3-propanediol, 1,2-butanediol, 1,3-butanediol, 2,3-butanediol and 1,4-butanediol), polyols (glycerol and poly(vinylalcohol)) and other non-alcoholic miscellaneous structures (acetone, acetonitrile, dimethylsulfoxide and dimethylformamide) serving as dissolution medium for the aspirated analytes, verapamil (determined via ruthenium or permanganate reaction) and endralazine (determined via permanganate reaction) whose

structures are depicted in Fig. 1.a and 1.b. These analytes were chosen according to previously known CL response found in screening test of several pharmaceutical substances with ruthenium complex and permanganate reagent. The aim of this project was investigation of solvent effect on two CL reactions (which solvents are profitable and what are the advantages of their use – monitoring of reproducibility, sensitivity, characteristics of calibration range). Water, the most common environment, was chosen as a reference solvent.

Experimental

Apparatus

The SIA system (see Fig. 2) was built from CAVRO XL 3000 piston pump (volume 2.5 mL Cavro Scientific Instruments Inc., USA), Vici Valco ten-port selection valve with electrical actuator (Valco Instruments Co., Inc., USA), model FS 970 Schoeffel Instruments Corp. (USA) fluorimetric flow detector (UV lamp switched off) equipped with a lab-made CL module with spiral geometry; the photomultiplier tube voltage was 400 V for measurements with permanganate and 300 V with ruthenium complex. The SIA system comprised manifold with a holding coil made of PTFE tubing (length 70 cm, i.d. 0.75 mm, volume 1.2 mL). The same tubing was spirally coiled on a 52 mm × 52 mm Perspex plate that replaced the secondary filter positioned in front of the photomultiplier window in the flow detector; this CL module had a central inlet, peripheral outlet and the diameter of the spiral was 24 mm. The control unit consisted of Pentium 75 MHz PC equipped with additional AT-MIO-16E10 data acquisition and AT-232/4 interface cards (National Instruments Corporation, USA). The whole system was operated by software (FaFSIA, Version 1.2); advanced data processing and was performed by LPMcalc, Version 1.0 (lab-made programs written in LabVIEW).

Reagents

All solutions were prepared from analytical grade chemicals and a Millipore Milli-Q RG ultra pure water. The standard verapamil hydrochloride, tris(2,2'-bipyridyl)dichlororuthenium(II)hexahydrate, sodium polyphosphate (hexametaphosphate), ethanol absolute Chromasolv, methanol spectrophotometric grade, 1,3-propanediol, 1,2butanediol, 1,3-butanediol, 1,4-butanediol, 2,3-butanediol, dimethylsulfoxide, acetonitrile were purchased from Sigma-Aldrich, Chemie GmbH (Germany). Cerium(IV)-ammonium sulphate and polyvinylalcohol were obtained from Fluka (Switzerland). Sulphuric acid, acetic acid, sodium acetate, 2-methyl-1-propanol, 1,2-ethanediol, N,N-dimethylformamide were from Lach-Ner, s.r.o (Lachema, Czech Republic). 1,2-propanediol was purchased from Riedel de Haën (Germany). Acetone and 2-propanol were from Penta (Czech Republic).

The pharmaceutical substance (endralazine or verapamil) was dissolved in water which served as stock solution for preparation of solvent solution in desired concentration.

SIA procedure

Reaction with permanganate: Zones of reagents and sample were automatically aspirated in following order into the holding coil: 30 μL of 80 mM hexametaphosphate solution, 30 μL of $1.0 \cdot 10^{-5}$ M endralazine in water/solvent solution or $2.0 \cdot 10^{-5}$ M verapamil in water/solvent solution or their appropriate blank solutions, 30 μL of 0.5 M sulphuric acid and 20 μL of 1 mM permanganate solution.

Reaction with $\text{ru}(\text{bipy})_3^{3+}$: Zones of reagents and sample were aspirated in following order into the holding coil: 50 μL of $7.5 \cdot 10^{-3}$ M Ce in $75 \cdot 10^{-3}$ sulphuric acid, 25 μL of 1 mM $\text{ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ solution, 15 μL of 0.2 M acetate buffer pH 5.4, 15 μL of $2 \cdot 10^{-7}$ M verapamil in water/solvent solution or its appropriate blank solution.

Determination: The zones were mixed by flow reversal and the arising CL product was pushed into the detector cell. The transient CL signal was recorded in the form of peaks and processed by our original software written in LabVIEW (involving the peak height calculations in nA). Each measuring cycle was carried out four times at ambient temperature and the mean values of the peak heights serves for data evaluation. The net CL signal was counted by subtracting the mean blank signal (B) from the mean raw signal (S) value. The net CL signal of each solvent, $\Delta\text{I}(\text{CL})$, was compared with net CL signal of water. Furthermore, the next object of monitoring was a ratio between mean raw sample signal and mean blank signal (S/B).

The best concentration of each solvent according to the highest net CL signal and also to the ratio between mean raw sample signal and mean blank signal (S/B) were compared with water. The best solvents of the best concentration were pointed out and calibration relation in low concentration of sample (verapamil and endralazine) was plotted to find limit of detection (LOD) and see changes on calibration function. During the whole experiment relative standard deviation of four consecutive measurements under the same conditions was evaluated.

Results and discussion

Pharmaceutical substances were tested whether they react with reagents (permanganate and $\text{ru}(\text{bipy})_3^{3+}$) to emit CL. The substance had to be soluble in water and tested solvents, stable in them, should give high CL response in these reaction. To find one compound which would fulfil all our presumptions appeared as a problem. Endralazine, soluble and stable in water, showed strong CL emission during reaction with permanganate but no CL with $\text{ru}(\text{bipy})_3^{3+}$. On the other hand, verapamil, soluble and stable in water, too, gave strong CL in the reaction with $\text{ru}(\text{bipy})_3^{3+}$ and the reaction with permanganate was weak. These two substances were chosen for the project as model samples to study the influence of chosen solvents.

Because the used solvents in CL reactions are monoalcohols (methanol, ethanol, 2-propanol) the test was focused on various alcohols. The list of the solvents comprised primary alcohols (ethanol, methanol, 1-propanol, 1-butanol, 2-methyl-1-propanol), secondary alcohols (2-propanol, 2-butanol), tertiary alcohol (2-methyl-2-propanol), diols (1,2-ethanediol, 1,2-propanediol, 1,3-propanediol, 1,2-butanediol, 1,3 butanediol, 2,3-butanediol and 1,4-butanediol), polyols (glycerol, polyvinylalcohol (PVA)). Also non-alcoholic solvents with miscellaneous structures were involved in the test (acetone, acetonitrile, dimethylsulfoxide and dimethylformamide).

Due to the fact that the blank solutions of both CL reaction systems (permanganate and $\text{ru}(\text{bipy})_3^{3+}$) gave certain CL response (the CL response was stronger in case of $\text{ru}(\text{bipy})_3^{3+}$), the net CL signal, $\Delta\text{I}(\text{CL})$, had to be calculated. Because the CL response of the blank solution varied extremely with each solvent and its concentration, other parameter was observed (S/B). The values representing $\Delta\text{I}(\text{CL})^*$ and $(\text{S/B})^*$, plotted in Table 1. and Figure 3., 4., 6., are obtained by dividing $\Delta\text{I}(\text{CL})$ or (S/B) of solvent by $\Delta\text{I}(\text{CL})$ or (S/B) of water. Thus, they are easily comparable, expressing how many times the respective solvent sensitised the CL reaction comparing with water (values of water $\Delta\text{I}(\text{CL})^*$ and $(\text{S/B})^*$ are 1).

Reaction of endralazine and permanganate

The dependence of $\Delta I(\text{CL})^*$ or $(\text{S/B})^*$ on solvent concentration is depicted in Figure 4.a-c or Figure. 4.d,e, respectively. There are only solvents which increased the CL yield more than water ($\Delta I(\text{CL})^*$ or $(\text{S/B})^*$ higher than 1).

Solvents as 2-methyl-2-propanol, PVA and all solvents with non-alcoholic miscellaneous structures did not increase the CL response than water according to $\Delta I(\text{CL})$ and these same solvents plus 2,3-butanediol, 2-methyl-1-propanol, 2-butanol, 1,2-ethanediol and glycerol had worse ratio S/B. Nevertheless, 2-propanol 100 % showed the highest $\Delta I(\text{CL})$ (125,5 times better than with water), the ratio S/B was similar as with water. A well-arranged survey of solvent concentration with high $\Delta I(\text{CL})$ and S/B is listed in Table 1.

Two solvents with the best CL response improvement, one according to $\Delta I(\text{CL})^*$ and second according to the ratio S/B* were tested furthermore in calibration study with low concentrations of endralazine, i.g. 2-propanol 80 % (the improvement with 2-propanol 100% solution was negligible) and 1,2-propanediol 2%, respectively. The calibration curves of endralazine are placed in Figure 5. The lower concentration which filled requirement of LOD was $5 \cdot 10^{-7}$ M in water and 2-propanol 80%. In the case when endralazine was prepared in 1,2-propanediol the LOD was $1 \cdot 10^{-7}$ M and thus it expressed better sensitivity. Both solvents influenced the course of the calibration curve (see Figure 5) and improved repeatability (better relative standard deviations).

Reaction of verapamil and $\text{ru}(\text{bipy})_3^{3+}$

The dependence of $\Delta I(\text{CL})^*$ or $(\text{S/B})^*$ on solvent concentration is shown in Figure 6.a-d or Figure. 6.e-g, respectively. There are only solvents which improved the determination against water.

All tested solvents brought an improvement according to $\Delta I(\text{CL})^*$ but 2-methyl-1-propanol, 1,2-ethanediol, glycerol, 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and dimethylformamide had worse ratio S/B.

Three solvents as dimethylformamide 40% and 1,2-butanediol 50% with the highest $\Delta I(\text{CL})^*$, (dimethylformamide 4.6 times higher than for water, 1,2-butanediol 4,2) and 1,2-propanediol 40% showing greatest ratio S/B were submitted to further testing of verapamil calibration (Fig. 7). However, the detection limit was the same for water and for the three tested solvents. The improvement was seen in repeatability which was better with all these solvents compared to water.

Reaction of verapamil and permanganate

This reaction of verapamil and permanganate is not very sensitive which mirrored in high verapamil concentration during the test ($2 \cdot 10^{-5}$ M with slight CL signal). To accomplish our project this section was also proceeded due to the interesting comparison of the same sample in two different CL reactions.

According to $\Delta I(\text{CL})^*$ the analysis of verapamil in several solvents was worse than with water: again solvents with non-alcoholic miscellaneous structures as in reaction with endralazine, PVA, 2-methyl-1-propanol and 2-butanol. Perhaps due to low net CL signals the second criterion showed that water is the best solvent.

Summary

Thank to several chromatographic articles with chemiluminescence detection interesting records can be read out due to organic mobile phase used. Mostly acetonitrile or methanol with usually aqueous buffer in different ratio serves as typical mobile phase in reversed-phase chromatography which has significant influence on the CL. In a

determination of arbutin and L-ascorbic acid by LC - CL reaction with permanganate [1] the negative effect of acetonitrile was found. Use of a mobile phase containing acetonitrile greatly quenched the CL signal and produced serious background whereas methanol resulted in lower background emission and the baseline was fairly smooth. Similar results obtained in our case with analytes, endralazine or verapamile, showed that acetonitrile is not compatible with permanganate reaction. Moreover, in determination of hydroquinone by permanganate reaction [4] acetonitrile and also dimethylformamide inhibited analytical signal and ethanol increased CL (unfortunately due to generation of bubbles ethanol was not submitted to further tests). Also effect of dimethylformamide on CL with permanganate corresponded with our results.

Another chromatographic article [12] dealing with sensitivity enhancement divided solvents according to mild and strong oxidative potency. This article postulated that solvents are compatible with mild oxidants (e.g. hydrogen peroxide) whereas strong oxidants like acidic permanganate are responsible for increase of baseline due to oxidation of the solvents that is undesirable in HPLC but can be overcome in FIA.

In CL reaction with $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$ the effect of four organic solvents (acetonitrile, acetone, methanol and 2-propanol) was already studied [2] (the solvents were tested up to 30% joined with phosphate buffer). CL intensity increased without significant increase of background signal with acetonitrile, acetone and methanol but use of 2-propanol resulted in lower CL along with dramatic increase of background signal. The last result did not correspond with ours because verapamile prepared in 2-propanol did not record any notable increase of the blank and the net CL signal showed relatively the best value among these four solvents. This discrepancy can be caused by different reaction conditions (phosphate buffer) or by dependence of solvent use on target analyte.

Chen and co-workers [13] in study of electrochemiluminescence of $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ postulated that monohydric alcohols showed CL decrease along with alkyl chain length increase and with increase in number of hydroxyl groups in a molecule, CL intensity increased with polyhydric alcohols. Majority of our tested solvents with single hydroxyl group represented increase up to 1.9 ($\Delta I(\text{CL})^*$) except for propanols. Solvents with 2 hydroxyl groups improved the determination much more. The highest value of $\Delta I(\text{CL})^*$ was 4.2 for 1,2-butanediol despite of longer alkyl chain. The position of hydroxyl group is very crucial because difference between 1,3- and 1,2- butanediol is more than 2 ($\Delta I(\text{CL})^*$).

Role of solvents in CL reactions has probably complex character: co-oxidation - alcohols are oxidized by strong oxidants to aldehydes, than to acids [12, 20] and stabilization of molecules [14].

Effect of the solvent is probably more but not purely dependent on used CL reagent than on target analyte which can be read out from Table 1 when comparing results of reaction of verapamil and $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$ with reaction of verapamil and permanganate. The permanganate reaction showed incompatibility with all solvents with miscellaneous structure and polyvinylalcohol.

Conclusion

The use of organic solvents as additives to aqueous analyte solutions can improve the analytical figures of merit in CL assays with permanganate or $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$ as reagents. Appropriate solvents may affect sensitivity, repeatability and linearity as shown in the SIA-CL assays of endralazine and verapamil as model analytes.

References

1. Y. Wei, Z. Zhang, Y. Zhang, Y. Sun, *Chromatographia* 65 (2007) 443-446
2. W.Y. Lee, T.A. Nieman, *Anal. Chim. Acta* 334 (1996) 183-191
3. T. Gamazo Climent, J.R. Albert-García, J. Martínez Calatayud, *Anal. Lett.* 40 (2007) 629-643
4. B. Gómez-Taylor Corominas, M. Catalá Icardo, L. Lahuerta Zamora, J.V. García Mateo, J. Martínez Calatayud, *Talanta* (2004) 618-625
5. C.M.P.G. Amorim, J.R. Albert-García, M.C.B.S. Montenegro, A.N. Araújo, J. Martínez Calatayud, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 421-427
6. A. Townshend, N. Youngvises, R.A. Wheatley, S. Liawruangrath, *Anal. Chim. Acta* 499 (2003) 223-233
7. H.Q. Wei, E.B. Liu, R.F. Ren, X.L. Zhao, X.X. Li, F.X. Jiang, *Spectrosc. Spect. Anal.* 25 (2005) 844-847
8. N. Anastos, S.W. Lewis, N.W. Barnett, D.N. Sims, *J. Forensic Sciences* 51 (2006) 45-51
9. H.Q. Wei, E.B. Liu, *J. Chin. Chem. Soc.* 52 (2005) 1043-1048
10. R. Chiba, M. Fukushi, A. Tanaka, *Anal. Sci.* 14 (1998) 979-982
11. Y. Gamba, M. Konishi, T. Sakata, Y. Okabayashi, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 27 (2004) 1661-1626
12. G.Z. Tsogas, D.L. Giokas, A.G. Vlessidis, N.P. Evmiridis, *J. Chromatogr A* 1107 (2006) 208-215
13. X. Chen, M. Sato, Y. Lin, *Microchem. J.* 58 (1998) 13-20
14. A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens, *Chemiluminescence in analytical chemistry*, Marcel Dekker, Inc., New York, 2001
15. K. Mervartová, M. Polášek, J. Martínez Calatayud, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45 (2007) 367-381
16. M. Polášek, M. Jambor, *Talanta* 58 (2002) 1253-1261
17. K. Mervartová, M. Polášek, J. Martínez Calatayud, *Anal. Chim. Acta* 600 (2007) 114-121
18. J.P. Choi, A.J. Bard, *Anal. Chim. Acta* 541(2005) 141-148
19. J. Růžička, G.D. Marshall, *Anal. Chim. Acta* 237 (1990) 329-343
20. S.I. Montalvo and J.D. Ingle, *Talanta* 40 (1993) 167-172

Figure 1. Structures of the tested analytes

a. - endralazine; b. - verapamil

Figure 2. Schematic view of SIA manifold

CS: carrier stream, SP: syringe pump, HC: holding coil, MSV: multi-position selection valve, D: detector, W: waste, R₁: Ce(IV) in sulphuric acid or hexametaphosphate, R₂: Ru(bipy)₃²⁺ complex or potassium permanganate, R₃: buffer or sulphuric acid, S: sample

Table 1. Overview of the studied solvents

E+P: oxidation of endralazine by permanagante; V+R: oxidation of verapamil by $\text{ru}(\text{bipy})_3^{3+}$, V+P: oxidation of verapamil by permanganate; $\Delta I(\text{CL})^*{}^1$: ratio of $\Delta I(\text{CL})$ of solvent and $\Delta I(\text{CL})$ or water ($\Delta I(\text{CL})$ is ratio of raw CL signal of sample and blank CL signal); (S/B)* is ratio of (S/B) of solvent and (S/B) of water (S/B = ratio between raw CL signal of sample and blank CL signal); PVA: polyvinylalcohol

Figure 3. Graph of the positive sensitization effect of each studied solvent

E+P: oxidation of endralazine by permanagante; V+R: oxidation of verapamil by $\text{ru}(\text{bipy})_3^{3+}$, V+P: oxidation of verapamil by permanganate; $\Delta I(\text{CL})^*{}^1$: ratio of $\Delta I(\text{CL})$ of solvent and $\Delta I(\text{CL})$ or water ($\Delta I(\text{CL})$ is ratio of raw CL signal of sample and blank CL signal); (S/B)* is ratio of (S/B) of solvent and (S/B) of water (S/B = ratio between raw CL signal of sample and blank CL signal); PVA: polyvinylalcohol

Figure 4. Solvents in tested concentration range in % (axis x) which sensitized the reaction of endralazine and permanganate

4.a-4.c are curves which represent $\Delta I(\text{CL})^*$ (axis y); 4.d-4.e are curves showing (S/B)* (axis y)

Figure 5. Calibration relation of endralazine (End) in water (a), 1,2-propanediol 2% (b) and 2-propanol 80% (c) in reaction with permanganate

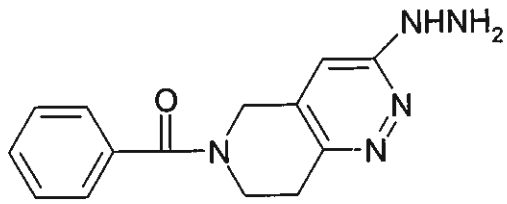
Figure 6. Solvents in tested concentration range in % (axis x) which sensitized the reaction of verapamil and $\text{ru}(\text{bipy})_3^{3+}$

6.a-6.d are curves which represent $\Delta I(\text{CL})^*$ (axis y); 6.e-6.g are curves showing (S/B)* (axis y)

Figure 7. Calibration relation of verapamil in water (4.), dimethylformamide 40% (1.), 1,2-butanediol 50% (2.) and 1,2-propanediol 40% (3.) in reaction with $\text{ru}(\text{bipy})_3^{3+}$.

Figure 1.

1.a



1.b

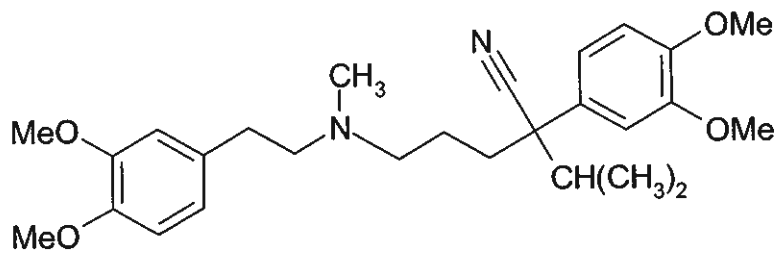


Figure 2.

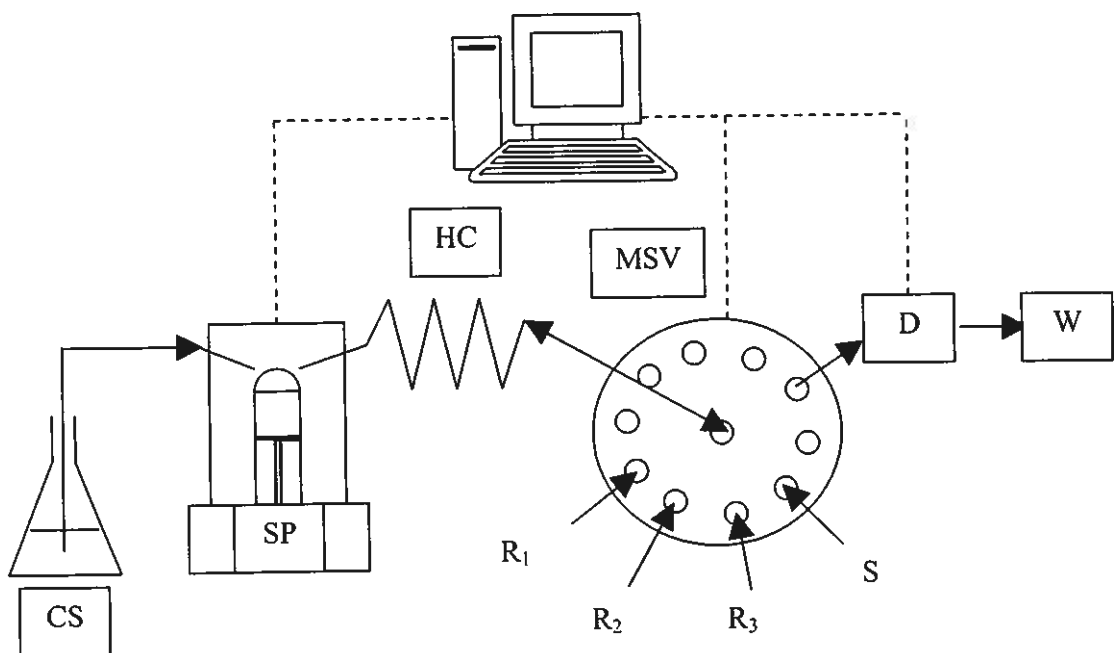


Table 1.

	solvent	examined range (%)			best concentration, ΔI(CL)*			best concentration, (S/B)*		
		E+P	V+R	V+P	E+P	V+R	V+P	E+P	V+R	V+P
1	ethanol	20-100	10-100	20-100	100%, 69.4	10%, 1.5	100%, 9.7	20%, 2.7	10%, 1.3	-
2	methanol	20-100	20-100	50-100	100%, 3.3	50%, 1.5	100%, 1.7	100%, 1.5	50%, 1.1	-
3	1-propanol	1-80	10-40	1-20	5%, 19.2	30%, 2.1	10%, 12.5	1%, 2.5	15%, 1.2	-
4	2-propanol	20-100	20-60	20-100	100%, 125.5	30%, 2.4	60%, 10.9	20%, 1.6	30%, 1.7	-
5	1-butanol	1-5	1-8	1-8	3%, 11.8	8%, 1.3	8%, 12.8	2%, 2.0	5%, 1.5	-
6	2-methyl-2-propanol	1-5	1-30	1-10	-	20%, 1.9	5%, 11.9	-	20%, 1.2	-
7	2-methyl-1-propanol	1-5	1-5	1-5	5%, 9.0	5%, 1.3	-	-	-	-
8	2-butanol	1-5	1-10	1-5	5%, 19.3	8%, 1.3	-	-	5%, 1.5	-
9	1,2-ethanediol	20-100	10-80	1-10	20%, 1.1	60%, 3.1	5%, 2.2	-	-	-
11	glycerol	2-20	1-20	1-10	2%, 3.7	5%, 2.7	5%, 2.9	-	-	-
12	1,2-propanediol	1-20	20-80	1-10	2%, 9.3	60%, 3.1	5%, 3.7	2%, 3.0	40%, 2.2	-
13	1,3-propanediol	1-60	5-20	5-40	20%, 24.0	15%, 2.1	10%, 3.1	1%, 2.8	-	-
14	1,2-butanediol	1-20	5-50	5-40	10%, 7.4	50%, 4.2	20%, 18.0	1%, 1.7	10%, 1.4	-
15	1,3-butanediol	1-20	2-20	5-20	20%, 31.3	20%, 1.9	10%, 6.0	2%, 1.9	5%, 1.2	-
16	1,4-butanediol	1-20	5-80	5-20	20%, 23.7	80%, 2.7	10%, 6.4	1%, 2.3	20%, 1.2	-
17	2,3-butanediol	0.5-5	3-10	0.5-5	0.5%, 24.6	5%, 1.9	1%, 30.7	-	-	-
18	dimethylformamide	10-80	1-40	1	-	40%, 4.6	-	-	-	-
19	dimethylsulfoxide	1-20	1-50	1	-	50%, 3.5	-	-	10%, 1.7	-
20	acetone	1-20	10-30	1	-	20%, 2.1	-	-	20%, 1.6	-
21	acetonitrile	1-10	10-30	1	-	10%, 1.4	-	-	10%, 1.3	-
22	PVA	0.001-0.01	0.001-0.4	0.01	-	0.4%, 1.6	-	-	0.1%, 1.2	-

Figure 3.

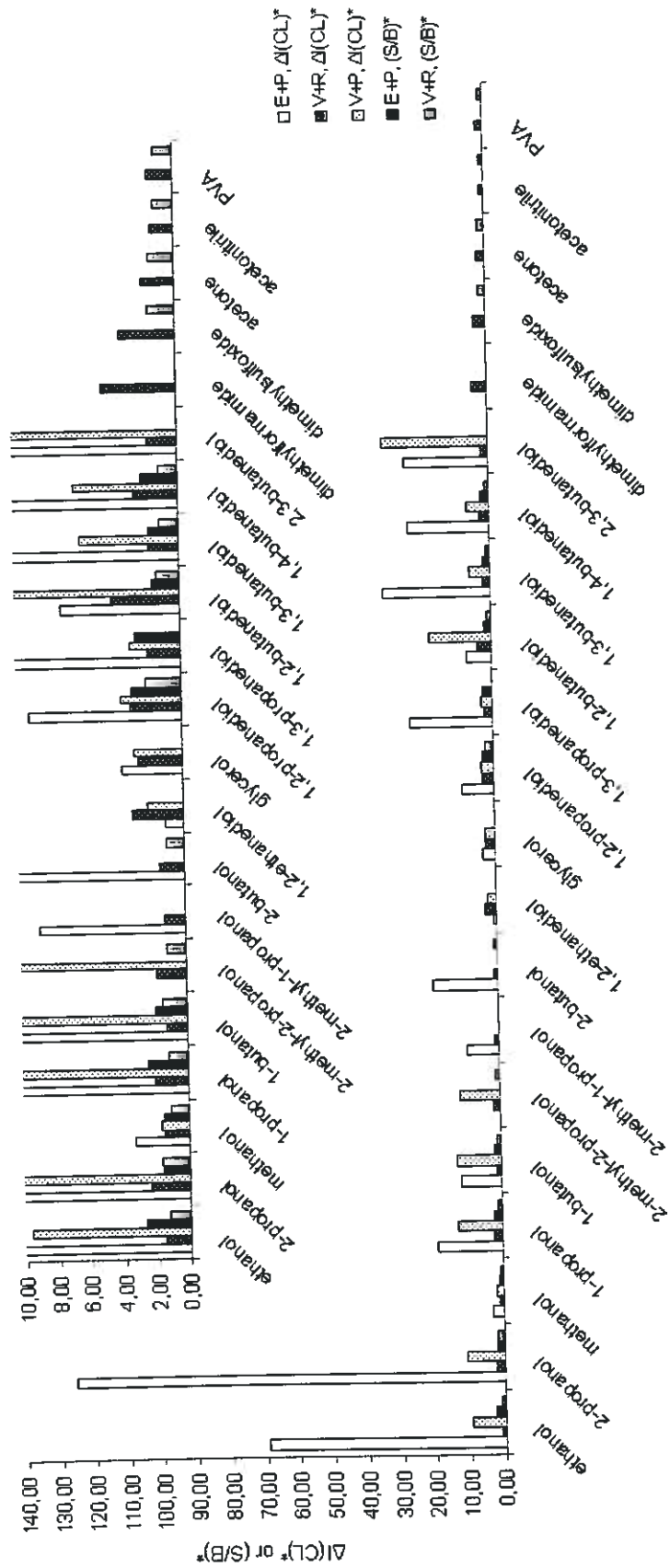


Figure 4.

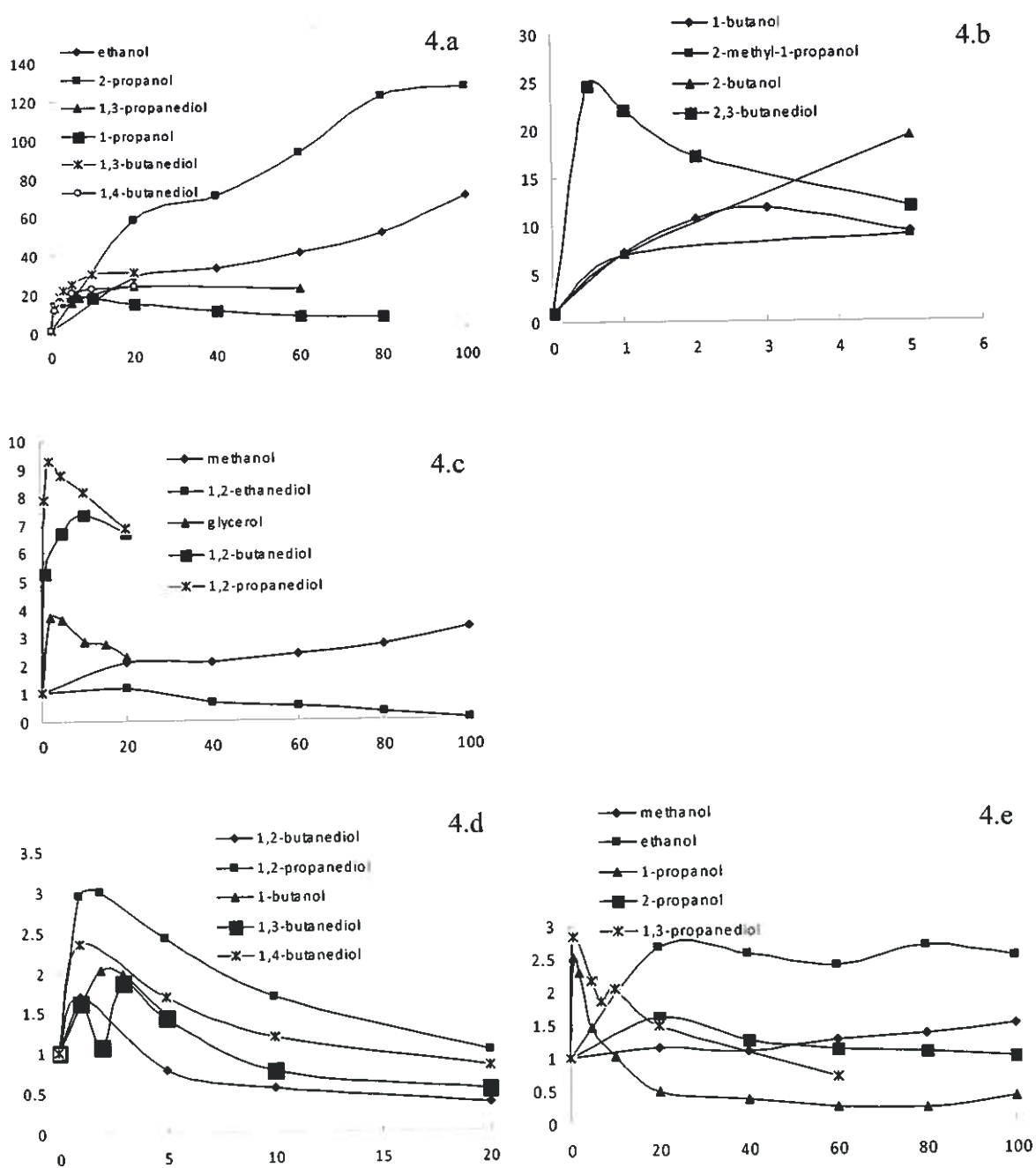
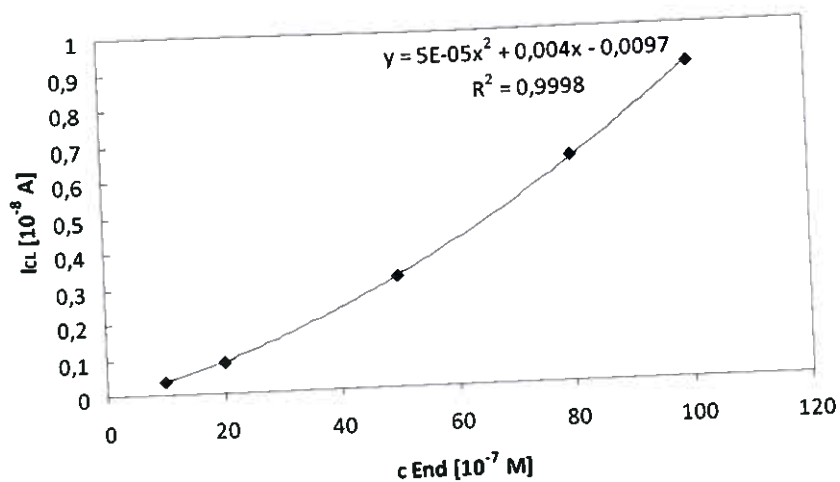
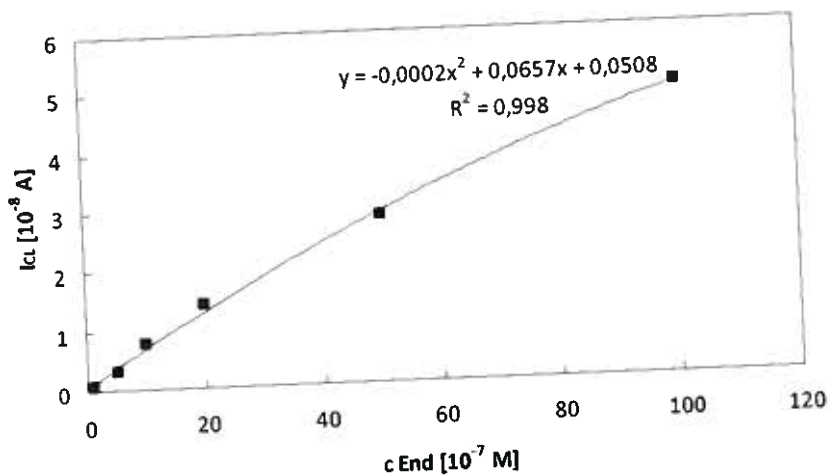


Figure 5.

5.a



5.b



5.c

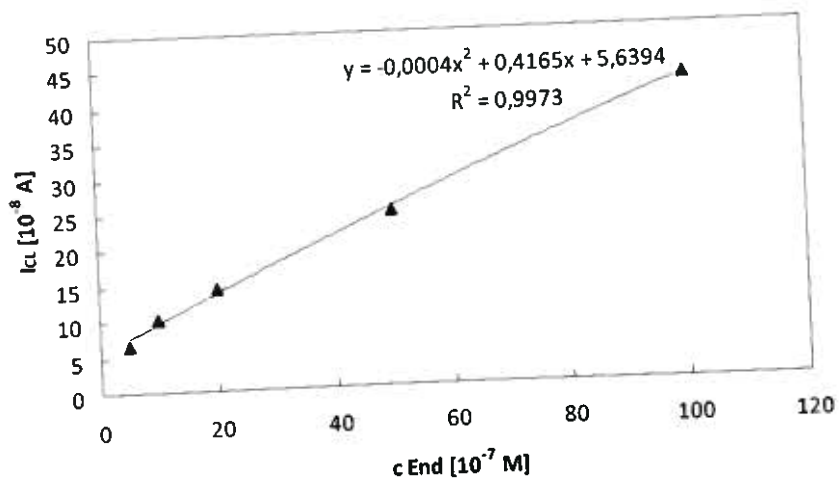


Figure 6.

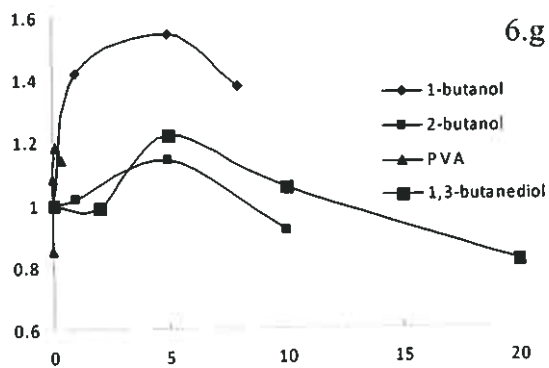
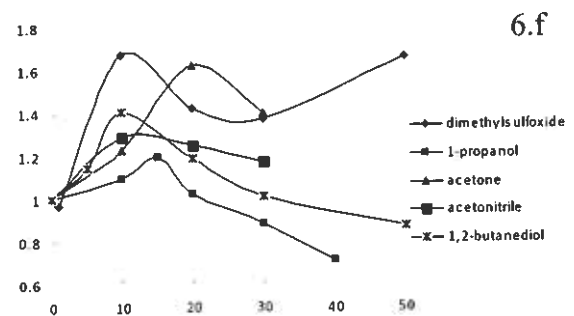
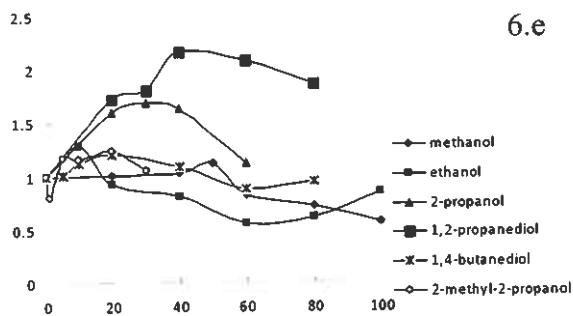
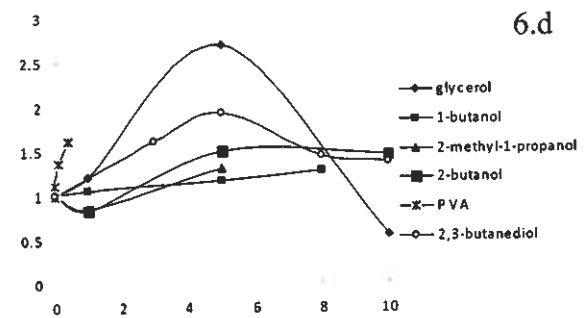
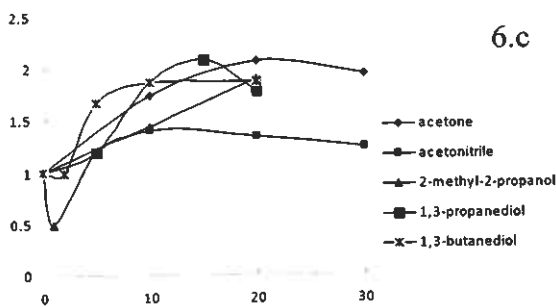
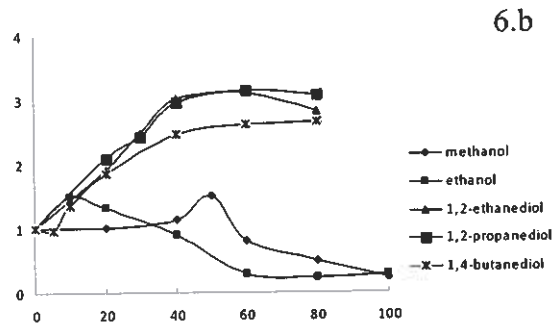
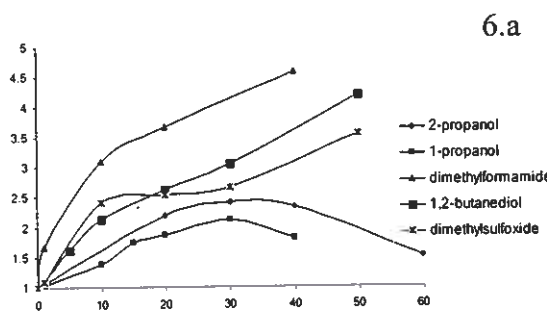
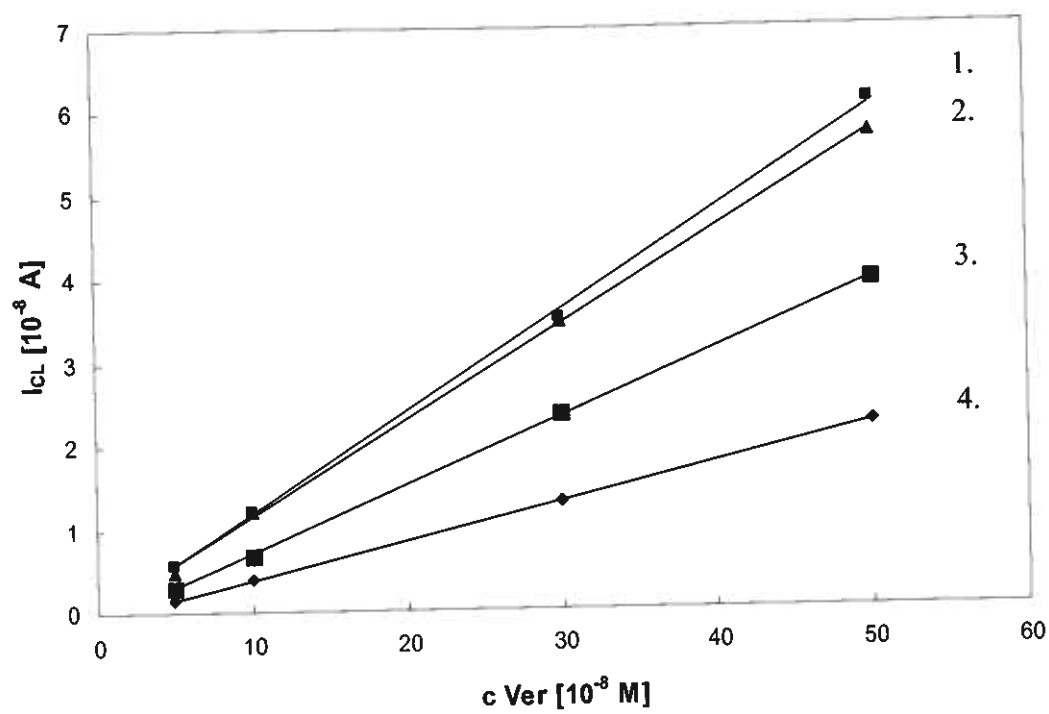


Figure 7.



5.7 Abstrakty prezentované na vědeckých konferencích

34. Syntéza a analýza léčiv, 2005, Brno

VYHLEDÁVACÍ STUDIE LÉČIV, POSKYTUJÍCÍCH VÝZNAMNOU CHEMILUMINISCENCI PŘI OXIDACI MANGANISTANEM A PŘI REAKCI S KOMPLEXEM $[\text{Ru}^{\text{III}}(2,2'\text{-bipyridin})_3]^{3+}$.

KATEŘINA MERVARTOVÁ^a, DANIEL LOPEZ^b, PETRA HOLÁ^a, MIROSLAV POLÁŠEK^a

^a Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta, Karlova Univerzita, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové

^b Department of Chemistry, University of Valencia, Valencia, Spain

Katerina.Mervartova@faf.cuni.cz

Automatizovanou metodou sekvenční injekční analýzy (SIA) bylo prozkoumáno chování 23 farmakologicky aktivních látek při reakci s manganistanem draselným a/nebo s komplexem $[\text{Ru}^{\text{III}}(2,2'\text{-bipyridin})_3]^{3+}$ s ohledem na případnou možnost jejich chemiluminiscenčního stanovení. Léčiva byla vybrána z různých farmakologických skupin; jejich strukturním znakem byl dusík v molekule (heterocykl, aromatický nebo alifatický amin).

Použitý počítačem ovládaný SIA systém byl sestaven na bázi 2,5-ml pístové pumpy Cavro XL 3000, deseticestného selekčního ventilu Vici-Valco a průtokového fluorescenčního detektoru Spectra-Physics FS970 upraveného pro měření intenzity chemiluminiscence. Intenzita přechodného chemiluminiscenčního signálu při oxidaci manganistanem byla sledována za následujících podmínek: aspirace zón 30 μl 0,1 mM léčiva (roztoky ve vodě, v 60% methanolu a 60% ethanolu), 39 μl 1 M kyseliny sírové, 3 μl 10 mM manganistanu draselného a 56 μl 0,1 M hexametafosfátu sodného a vytlačení smíšené zóny reaktantů do detektoru průtokovou rychlostí 100 $\mu\text{l/s}$. Mezi léčiva poskytující intenzivní chemiluminiscenci se zařadily bopindolol, cimetidin, indometacin, endralazin a noradrenalin.

Komplex $[\text{Ru}^{\text{III}}(2,2'\text{-bipyridin})_3]^{3+}$ je nestálé oxidační činidlo, které bylo připraveno *in situ* v SIA systému reakcí redukované formy $[\text{Ru}^{\text{II}}(2,2'\text{-bipyridin})_3]^{2+}$ s Ce(IV). Vlastní chemiluminiscenční reakce probíhala v acetátovém pufru o pH 5,6 za těchto podmínek: aspirace zón 71 μl 10 mM Ce(IV) v 50 mM kyselině sírové, 30 μl 1 mM $[\text{Ru}^{\text{II}}(2,2'\text{-bipyridin})_3]^{2+}$ v 0,05 M kyselině sírové, 29 μl acetátového pufru pH 5,6 a 15 μl 0,1 mM roztoku léčiva v 50% ethanolu a vytlačení smíšené zóny reaktantů do detektoru průtokovou rychlostí 100 $\mu\text{l/s}$. Významnou chemiluminiscenční emisi poskytovaly látky: metoprolol, noradrenalin, verapamil, nefopam, diltiazem a indometacin.

Vzhledem k tomu, že pouze omezený počet látek je schopný chemiluminiscence za definovaných reakčních podmínek (selektivita), je možné chemiluminiscenční detekci využít při jejich rutinním stanovení ve středně složité matrici. Další fází projektu bude vypracování citlivé a rychlé SIA-chemiluminiscenční metody stanovení vytypovaných léčiv v reálných farmaceutických přípravcích.

Projekt byl vypracován s podporou Výzkumných záměrů MŠMT, MSM 0021620822.

34. Syntéza a analýza léčiv, 2005, Brno**AUTOMATIZACE SLEDOVÁNÍ LIBERACE LÉČIV Z MASTÍ
TECHNIKOU SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZY**

**KATEŘINA MERVARTOVÁ, JANA KLIMUNDOVÁ, HANA SKLENÁŘOVÁ,
MIROSLAV POLÁŠEK**

*Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta, Karlova Univerzita, Heyrovského 1203, 500
05 Hradec Králové*

Katerina.Mervartova@faf.cuni.cz

Liberační studie léčiva z masti charakterizuje uvolňování účinné látky z polotuhého léčivého přípravku. Provedení takového testu, vycházející ze směrnice FDA (Food and Drug Administration, USA), představuje užití Franzovy difúzní cely obsahující dva kompartmenty oddělené obvykle syntetickou membránou. Vzorek masti je aplikován na horní stranu membrány, přes kterou léčivo difunduje do kompartmentu obsahujícího akceptorovou tekutinu. Koncentrace léčiva v akceptorové tekutině je monitorována vhodnou analytickou metodou, přičemž vzorky jsou odebírány v pravidelných časových intervalech po dobu 6 hodin. Pro stanovení liberačního profilu je doporučeno měření šestkrát opakovat.

Cílem našeho výzkumu je automatizace celé liberační studie pomocí sekvenčního injekčního analyzátoru (SIA) zahrnující paralelní provedení několika testů najednou. K realizaci projektu byl sestaven SIA systém složený z 5ml-pístové pumpy, dvou 8-cestných selekčních ventilů (hlavní a přídatný), pomocné peristaltické pumpy, fluorescenčního detektoru a 3 Franzových cel (o objemu 15 ml) temperovaných na 32°C pomocí oběhového termostatu ve vodní lázni.

Celý SIA systém byl ovládán počítačovým programem. Peristaltická pumpa zajišťovala kontinuální cirkulaci akceptorové tekutiny uzavřenou dávkovací smyčkou tak, aby koncentrace odebraného vzorku v přesném časovém intervalu korespondovala s koncentrací léčiva v akceptorové tekutině. Roztoky standardu pro zhotovení kalibrační závislosti byly aspirovány přes přídatný selekční ventil.

Jako testovaný léčivý přípravek byla vybrána mast s kyselinou salicylovou. Z akceptorové tekutiny (vodný fosfátový pufr o pH 7,4) bylo odebíráno 50 μ l vzorku v intervalu 15 min a fluorimetricky stanovena koncentrace kyseliny salicylové. Optimalizovaný ovládací program řídil celý test po dobu 6 hodin, zaznamenával liberační profil léčiva a automaticky prováděl měření kalibračních roztoků na konci studie.

Hlavními výhodami celého systému jsou: úplná automatizace liberační studie, on-line monitorování koncentrace uvolněného léčiva v akceptorové tekutině, automatické doplňování odebraného objemu, automatické vyhotovení kalibrační křivky a díky malému objemu odebíraných vzorků je umožněna také vyšší frekvence měření bodů liberační křivky než při manuálně provedené studii.

Projekt byl podporován Grantovou agenturou Univerzity Karlovy, grant č. 313/2005/B-CH/FaF a Výzkumnými záměry MŠMT, MSM 0021620822.

**Instrumental methods of analysis, modern trends and applications
(IMA05), 2005, Kréta**

**AUTOMATED SIA-FLUORIMETRIC METHOD FOR RELEASE
TESTING OF TOPICAL FORMULATIONS CONTAINING
SALICYLIC ACID**

K. Mervartová*, J. Klimundová, H. Sklenářová, M. Polášek

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University,

Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic;

e-mail: Katerina.Mervartova@faf.cuni.cz

Changes in thermodynamic properties of active substance (drug) and in the overall composition of ointment influence the drug release from this topical dosage form. The release of the drug is one of several criteria used to characterize finished preparations. At present there is no official rule for the performance of such release testing. There exist only recommendations (guidelines) from OECD and FDA. In vitro release test (FDA) recommends Franz diffusion cell fitted with a synthetic membrane; the test should be performed in multiple replicates (6 cells are recommended). Diffusion of the drug from the topical product to and across the membrane is generally monitored by analyzing sequentially collected samples of the acceptor fluid. We developed an on-line fully automated and simple method for monitoring the release of salicylic acid from ointments according to OECD and FDA guidelines with multiple parallel sampling from several Franz cells. The automation was achieved by using the sequential injection analysis (SIA) technique. The SIA system employed consists of bi-directional 5-ml syringe pump, 8-position selection valve, additional 8-port selection valve (serving as an "auto-sampler"), auxiliary peristaltic pump, fluorescence detector and three Franz cells maintained at 32°C (water bath). The ointment containing salicylic acid is placed on top of the membrane which is in contact with the acceptor liquid (15 ml of aqueous phosphate buffer of pH 7.4). In predefined time intervals the samples of the acceptor liquid (50 µl) are aspirated from each of the 3 cells and dispensed to a flow-through fluorescence detector to determine the concentration of salicylic acid (excitation and emission wavelengths 297 nm and 405 nm, respectively). The system automatically replenishes the acceptor medium in each cell. The calibration curve is rectilinear in the range 1 – 50 mg/l, repeatability expressed as RSD (n = 10) is 0.52% at 1.0 mg/l of salicylic acid. The main advantages of the system are: automated on-line monitoring of release test from several Franz cells, small volumes of acceptor medium analysed, automated replenishing of the acceptor medium and possibility of higher sampling frequency compared to manually performed tests.

Financial support by the Grant Agency of Charles University, Grant No. 313/2005/B-CH/FaF and by the Czech Ministry of Education, Grant No. MSM 0021620822, is gratefully acknowledged.

10. International Conference on Flow Analysis, 2006, Porto

SIA-chemiluminescent determination of indomethacin in pharmaceutical formulations

Kateřina Mervartová, Miroslav Polášek

Department of analytical chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University

Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

Indomethacin was submitted to screening test to point out substances with marked chemiluminescent response. After preliminary test it was desirable to continue with substance indomethacin in optimization and validation of the method due to interesting response. The new method was proposed and applied to pharmaceutical formulations.

The method is based on oxidation of indomethacin by ruthenium complex Ru(bipy)(III) which is non stable and thus prepared in situ in the SIA system by oxidation with Ce in sulfuric acid. Using buffer is usually profitable with such system so different buffers were implemented to the system but the most advantages one appeared component of acetic/acetate buffer – sodium acetate. Various solvents suitable for indomethacin were examined. According to the considerateness for SIA system and to the highest response ethanol 50 % (vol.) was further tested. The optimal conditions were estimated as 41 μl of 15 mM Ce (IV) in 50 mM H_2SO_4 , 30 μl 0.5 mM ruthenium complex, 16 μl of 0.4 M sodium acetate and 15 μl of indomethacin in 50 % (vol.) ethanol.

Calibration response was studied in range 10^{-7} – $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l. The curve was expressed as second degree equation $y = -0.156x^2 + 22.193x + 0.767$ with correlation coefficient $r = 0.9997$. Linear response described by equation $y = (19.51 \pm 1,39)x - (4,43 \pm 1,43)$, r ranged from 0,9984 to 0,9998 was in the range 10^{-7} to 10^{-5} mol/l.

The detection limit was estimated as 10^{-7} mol/l. Repeatability ranged from $5 \cdot 10^{-7}$ M 2.40 % and for $7 \cdot 10^{-6}$ 2.02 %. One determination lasted 20s, so 180 determinations per 1 hour.

Finally the method was applied to determination of I in pharmaceutical formulations Indobene gel and Vonum cutan (ointment) with satisfactory results.

The project will continue by investigation of automation of parallel release testing by sequential injection analysis.

The authors greatly appreciate financial supports coming from agencies FRVS Ministry of education CR, grant No. 292/2006 and GAUK, grant No. 313/2005.

Joint Meeting, 2006, Marburg**SIA-AUTOMATION OF RELEASE TESTS ACCORDING TO RECOMMENDED GUIDELINES**

Mervartová K., Polášek M., Hájková R., Sklenářová H.

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 50005 Hradec Králové, Czech Republic

OECD and FDA guidelines recommend to perform release test to characterize finished semisolid formulation and to compare two batches. FDA recommends Franz diffusion cell fitted with a membrane that would be best a native skin. The release of pharmaceutical compound must be observed at least 6 hours (for synthetic membrane, for skin it is 48 hours). The guidelines for comparison assay describe testing of 6 cells at the same time to obtain valuable and precise data. It is desirable to automate the test to accelerate, make more effective, precise and simplify test performance.

Sequential injection analysis (SIA) is a tool for automation and consists of bi-directional 5-ml syringe pump, 8-position selection valve, additional 8-position selection valve, auxiliary peristaltic pump, detector and Franz cells maintained at 32°C (water bath). Tested semisolid preparation is placed on membrane or skin and the pharmaceutical compound releases to acceptor compartment of Franz cell. The concentration of released compound in acceptor medium (phosphate buffer pH 7.4) is determined in predefined time intervals.

The proposed automated method was applied to monitor release characteristic of ointments containing salicylic acid with fluorescence detection and indomethacin with chemiluminescence detection.

The authors acknowledge financial support by the Grant Agency of Charles University, Grant No. 313/2005/B-CH/FaF and the Czech Ministry of Education, Grant No. MSM 0021620822.

14. ICFIA, 2006, Berlín

Influence of solvents on chemiluminescence reactions with permanganate and tris[(2,2'-bipyridyl)]ruthenium(III) studied in sequential injection analysis

Kateřina Mervartová, Miroslav Polášek

Department of analytical chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 50005 Hradec Králové

Katerina.Mervartva@faf.cuni.cz

The aim of this study was to investigate the sensitization of chemiluminescence (CL) reactions (permanganate system and tris[(2,2'-bipyridyl)]ruthenium(III) system) by solvents which include mainly alcoholic group in their structure. In the literature some of them as methanol, ethanol can be found. Deep study on this topic is desirable.

The sequential injection analysis consists of 2,5-ml syringe pump Cavro XL 3000, 10 – port selection valve Vici-Valco a flow-through-fluorescence detector Spectra-Physics FS970 set for CL measurement. Two CL reactions were used for testing: oxidation of drug endralazine by permanganate in sulfuric acid with presence of hexametaphosphate and oxidation of drug verapamil by tris[(2,2'-bipyridyl)]ruthenium(III) which was generated on-line in SIA analyzer by Ce(IV) in sulphuric acid, the last reaction proceeded under condition of acetate buffer pH 5.4. Tested solvents can be sorted into primary alcohols (methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol, four stereoisomers of butanol), secondary alcohols (ethyleneglycol, 1,2-propanediol, 1,3-propanediol, 1,2-butanediol, 1,3-butanediol, 2,3-butanediol, 1,4-butanediol) tertiary alcohol (glycerol), polyalcohol (polyvinylalcohol) and other solvents (water, acetone, acetonitrile, dimethylsulfoxide, dimethylformamide).

All solvents were tested in wide concentration range. Subsequently best concentrations of each solvent were compared together (comparative parameter was counted as deference between the signal of the drug (s) and the signal of the blank (b) divided by the signal of the blank $\frac{s-b}{b}$). Solvents as 1,2-propanediol, 2-propanol, n-butanol, 1,2-butanediol, methanol, ethanol, 1,4-butanediol, 1,3-butanediol, 1-propanol improved the measurement against water in both CL reactions (better comparative parameter than for water), dimethylsulfoxide, acetone, acetonitrile, t-butanol, polyvinylalcohol, sec-butanol only in the reaction with ruthenium complex and 1,3-propanediol only in the reaction with permanganate.

We thoroughly appreciate financial support coming from Grant Agency of Charles University, grant No. 85107/B/2007/FaF, Zentiva a.s. and Research Project MSM 0021620822.

36. Syntéza a analýza léčiv, 2007, Bratislava

**CHEMILUMINISCENČNÍ STANOVENÍ VERAPAMILU
POMOCÍ SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZY
V TABLETÁCH****KATEŘINA MERVARTOVÁ¹, MIROSLAV POLÁŠEK¹, DANIEL LOPÉZ²,
JOSÉ MARTÍNEZ CALATAYUD²**¹ *Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Heyrovského 1203, 50005 Hradec Králové*² *Department of Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Valencia, Valencia, Spain
Katerina.Mervartva@faf.cuni.cz*

Naším cílem bylo vyvinout metodu pro stanovení léčiva verapamilu v tabletách založenou na chemiluminiscenční detekci a sekvenční injekční analýze (SIA). Verapamil patří do skupiny blokátorů kalciového kanálu, který má vasodilatační a antihypertenzní účinky. Toto léčivo se používá zejména pro léčbu ischemické choroby srdeční (angina pectoris, při stavech po infarktu myokardu), při léčbě srdečních arytmií a při léčbě hypertenze. Komerčně je léčivo dostupné ve formě tablet nebo kapslí.

Počítačem ovládaný SIA systém byl sestaven z 2,5-ml pístové pumpy Cavro XL 3000, deseticestného selekčního ventilu Vici-Valco a průtokového fluorescenčního detektoru Spectra-Physics FS970 upraveného pro měření intenzity chemiluminiscence. Detekční reakce byla založena na použití nestálého oxidačního činidla $[\text{Ru}^{\text{II}}(2,2'\text{-bipyridin})_3]^{3+}$, které bylo připraveno *in situ* v SIA systému reakcí redukované formy $[\text{Ru}^{\text{II}}(2,2'\text{-bipyridin})_3]^{2+}$ s Ce(IV) v kyselině sírové.

Koncentrace kyseliny sírové, céru, dvojmocného ruthenia, vhodný pufru a jeho pH, parametry ovládacího programu (ideální velikosti aspirovaných zón a rychlosti průtoku) byly optimalizovány při vývoji metody. Studium pufrů bylo rozšířeno o pufrů, které zajišťují žádoucí pH ale dosud jejich vliv na chemiluminiscenční reakci s komplexem ruthenia nebyl popsán v dostupné literatuře. Nejvyšší výtěžnost reakce byla zaznamenána za těchto podmínek: aspirace 50 $\mu\text{l/s}$, 69 μl 7,5 mM Ce(IV) v 75 mM kyselině sírové, 25 μl 1 mM $[\text{Ru}^{\text{II}}(2,2'\text{-bipyridin})_3]^{2+}$, 13 μl acetátového pufru pH 5,4 a 15 μl roztoku léčiva v 50% methanolu a vytlačení smíšené zóny reaktantů do detektoru průtokovou rychlostí 100 $\mu\text{l/s}$.

Lineární závislost koncentrace verapamilu na intenzitě chemiluminiscence byla stanovena v rozmezí koncentrací 0.01 to 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ s korelačním koeficientem 0,9997. Nalezený limit detekce (3/N) byl 10 nmol/l. Frekvence dávkování byla 180 vzorků/hod. Dále byla provedena studie týkající se robustnosti a možných interferenčních látek v tabletách.

Na závěr byla metoda aplikována na komerčně dostupný přípravek Isoptin 40mg (tbl.) a výsledek statisticky porovnán s výsledky ze spektrofotometrického měření verapamilu podle Britského lékopisu 2004. Metoda je vhodná pro stanovení verapamilu v tabletách.

Projekt byl podporován Grantovou agenturou Univerzity Karlovy, grant č. 85107/B/2007/FaF a Výzkumnými záměry MŠMT, MSM 0021620822.

6 Grantová podpora

Během prezenční formy studia byla autorka disertační práce řešitelkou 2 jednoročních grantů Fondu rozvoje vysokých škol:

- č. 292/2006 Chemiluminiscenční stanovení léčiv metodou sekvenční injekční analýzy
- č. 948/2007 Automatizace studia kinetiky enzymových reakcí technikou sekvenční injekční analýzy,

a hlavní řešitelkou grantu Grantové agentury Univerzity Karlovy (2007-2008):

- č. 85107/2007 Chemiluminiscenční stanovení vybraných léčiv metodou sekvenční injekční analýzy

a spoluřešitelkou grantu Grantové agentury Univerzity Karlovy (2005-2006):

- č. 313/2005 Automatizace liberačních testů topických léčivých přípravků s užitím Francovy cely v SIA systému.

7 Závěr

Tato práce je věnována chemiluminiscenčnímu stanovení vybraných léčiv s využitím moderních průtokových metod.

V první fázi byla vypracována souhrnná rešeršní práce zabývající se metodami chemiluminiscenčního stanovení farmaceuticky významných látek technikou průtokové a sekvenční injekční analýzy, publikovanými od roku 2001 do roku 2006. Rešeršní práce byla uveřejněna v zahraničním časopise *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 45 (2007) str. 367-381. Většina publikovaných metod byla založena na CL reakcích luminolu, siřčitanu, manganistanu a komplexu $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{3+}$.

V další etapě byly zkoumány předběžným screeningem možnosti SIA-CL stanovení 23 různých léčiv na základě CL reakcí s manganistanem v kyselém prostředí a s komplexem $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{3+}$. Z těchto látek byly vytipovány verapamil, blokátor kalciových kanálů v srdečním svalu pro léčbu arytmií a hypertenze, a indometacin, analgetikum a antiflogistikum používané k tlumení bolesti pohybového aparátu. Stanovení bylo založeno na přímé oxidaci obou léčiv komplexem $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{3+}$. Vyvinuté metody byly validovány a byla prokázána možnost SIA-CL stanovení těchto léčiv s dostatečnou přesností a správností a nízkými detekčními limity, u verapamilu 10 nmol/l a u indometacinu 50 nmol/l. Metoda stanovení indometacinu byla aplikována na analýzu komerčně vyráběných přípravků ve formě masti a gelu, viz publikace v časopise *Analytica Chimica Acta* 600 (2007) str. 114-121. Verapamil byl navrženou SIA-CL metodou stanoven v tabletách (práce ještě nebyla publikována).

Z předběžného screeningu vyplynula i další léčiva, jako bopindolol, diltiazem, norepinefrin a endralazin, která pravděpodobně bude možné stanovit SIA-CL metodou.

Při studiu možnosti využití moderních průtokových metod byla testována multikomutační metoda, pomocí které bylo automatizováno chemiluminiscenční stanovení chlorsulfuronu. Přestože reakce tohoto pesticidu s manganistanem nevykazovala žádnou luminiscenci, po začlenění fotochemického reaktoru do multikomutačního analyzátoru (UV-lampy) bylo dosaženo dostatečně silné CL odezvy. Za optimálních podmínek bylo možno stanovit i stopy chlorsulfuronu na

úrovni 100 ppb (1 ng ml^{-1}). Tato metoda byla plně validována a aplikována na různé druhy vod. Vývoj a validace metody jsou prezentovány v časopise *Analytical Letters* 38 (2005) str. 179-194.

Při vývoji metody SIA-CL stanovení verapamilu a indometacinu byl prokázán pozitivní vliv metanolu a etanolu na intenzitu chemiluminiscenční odezvy. V další fázi projektu byl proto sledován vliv 22 rozpouštědel (zejména primárních, sekundárních a terciárních alkoholů, diolů a polyolů) na intenzitu CL verapamilu a endralazinu jako modelových látek při reakci s manganistanem a komplexem $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{3+}$. U endralazinu bylo pozorováno podstatné zvýšení CL signálu při dávkování roztoku analytu v 80% 2-propanolu a 2% 1,2-propandiolu. U reakce verapamilu s komplexem ruthenia(III) bylo největší zesílení CL pozorováno při dávkování roztoku analytu v 50% 1,2-butandiolu, 40% dimethylformamidu a 40% 1,2-propandiolu. Analyty rozpuštěné v těchto smíšených rozpouštědlech vykazovaly lepší opakovatelnost výsledků stanovení SIA-CL metodou.

V rámci vývoje automatizovaných analytických metod pro kontrolu technologické kvality léčivých přípravků byla navržena a otestována SIA metoda s fluorescenční detekcí, umožňující sledovat rychlost uvolňování léčiva (salicylové kyseliny) z polotuhého léčivého přípravku. Tento experiment byl součástí projektu, jehož výstupem je plně automatizovaná metoda splňující požadavky autorit jako FDA pro automatizované sledování liberačního profilu mastí a gelů včetně automatické kalibrace a zpracování výsledků. Navržený SIA systém zahrnoval tři speciálně vyrobené Franzovy cely, umožňuje však sledovat najednou až 9 těchto cel. Vývoj a návrh tohoto SIA analyzátoru byl uveřejněn v časopise *Analytica Chimica Acta* 573-574 (2006) str. 366-370.

8 Shrnutí

Tato disertační práce se zabývá chemiluminiscenčním resp. fluorescenčním stanovením farmaceuticky významných látek moderními průtokovými metodami.

Teoretická část předkládá přehled dosavadních vědeckých znalostí o průtokových metodách, chemiluminiscenčních reakcích a možnostech CL detekce v průtokových systémech. Z průtokových metod jsou rozebrány především průtoková injekční analýza, sekvenční injekční analýza a multikomutační metoda. Následují základy luminiscence, teorie chemiluminiscence a významné CL reakce ve FIA a SIA technikách. Metody, zabývající se automatizací chemiluminiscenčního stanovení farmaceuticky významných látek technikou FIA a SIA, které byly publikovány v letech 2001 až 2006, byly analyzovány a zpracovány do rešeršního článku, který byl uveřejněn v odborném časopise.

Praktickou část disertační práce lze rozdělit na dva směry. První směr se zabývá vývojem originálních automatizovaných SIA metod CL analýzy, které mohou být uplatněny buď při jistění jakosti léčivých přípravků (stanovení verapamilu v tabletách, idometacinu v masti a gelu a sledování uvolňování účinné látky kyseliny salicylové z polotuhého léčivého přípravku) nebo při rutinním sledování znečištění složek životního prostředí (stanovení pesticidu chlorsulfuronu ve vodě a půdních extraktech).

Druhý směr se zaměřil na hledání vhodných organických rozpouštědel pro zvýšení chemiluminiscenčního výtěžku u CL reakcí manganistanu a komplexu $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{3+}$ s modelovými léčivy verapamilem a endralazinem. Pozitivní vliv na zvýšení výtěžku chemiluminiscence a zlepšení přesnosti stanovení byl doložen u 2-propanolu, 1,2-propandiolu, 1,2-butandiolu a dimethylformamidu.

9 Summary

This dissertation thesis concerns about chemiluminescence or fluorescence determination of pharmaceutical compounds by modern flow methods.

The theoretical part gives a recent overview of scientific knowledge about flow methods, chemiluminescence reactions and the application of CL detection in the flow methods. The flow injection analysis, sequential injection analysis and multicommutation are mainly discussed. The next topic is focused on principles of luminiscence techniques, mainly chemiluminescence and important chemiluminescence reactions. Papers dealing with automated chemiluminescence determination of pharmaceutical compounds by sequential and flow injection analysis published in years 2001-2006 were collected and analysed in a review article which was published in a scientific journal.

The experimental part may be divided into two issues. The first one deals with the proposal of original automated analytical SIA-CL methods. These methods can be applied either in quality control of pharmaceuticals (verapamil assay in tablets, indomethacin assay in ointment and gel and release test of semisolid dosage form containing salicylic acid) or can be utilized in routine measurement of environmental samples (chlorsulfuron assay in waters and soil extracts).

The second issue is focused on the study of possible enhancement of chemiluminescence yield of chemiluminescence reactions of verapamil and endralazine with permanganate or $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{3+}$ complex by suitable organic solvents. Positive effect on the CL enhancement and better repeatability of SIA-CL results was attained with mixed aqueous-organic media containing 2-propanol, 1,2-propanediol, 1,2-butanediol or dimethylformamide.

10 Literatura

1. S.D. Kolev, I.D. McKelvie, *Comprehensive Analytical Chemistry, Wilson&Wilson's*, Amsterdam, 2008
2. M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, *Flow-injection analysis, principles and applications*, Ellis Horwood Limited, Chichester, 1987
3. J. Růžička, E.H. Hansen, *Flow injection analysis Second edition*, Wiley-Interscience, New York, 1988
4. A.M. García-Campaña, W.R.G. Bayens, *Chemiluminescence in analytical chemistry*, Marcel Dekker, Inc., New York, 2001
5. A.M. García-Campaña, W.R.G. Bayens, X. Zhang, F. Alés, L. Gámiz, *Ars. Pharm.* 42 (2001) 81-107
6. P. Solich, H. Sklenářová, M. Polášek, R. Karlíček, J. *Flow Injection Anal.* 18 (2001) 13-19
7. J. Klimundová, H. Sklenářová, U.F. Schaefer, P. Solich, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 893-898
8. D. Šatínský, P. Solich, P. Chocholouš, R. Karlíček, *Anal. Chim. Acta* 499 (2003) 205-214
9. P. Chocholouš, P. Solich, D. Šatínský, *Anal. Chim. Acta* 600 (2007) 129-135
10. J. Martínez Calatayud, *Flow injection analysis of pharmaceuticals*, Taylor & Francis, Londýn, 1996
11. M. Miró, V. Cerdá, J.M. Estela, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 199-210
12. C.E. Lenehan, N.W. Barnett, S.W. Lewis, *Analyst* 127 (2002) 997-1020
13. M. Catalá Icardo, J.V. García Mateo, J. Martínez Calatayud, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 366-378
14. J. Růžička, *Analyst* 125 (2000) 1053-1060
15. M. Miró, E. H. Hansen, *Anal. Chim. Acta* 600 (2007) 46-57
16. Růžička J.: *Flow Injection – CD*, the 2nd edition 2002
17. M. Trojanowicz, *Flow injection analysis, instrumentation and applications*, World Scientific Ltd., Singapur, 2000
18. M.I. Evgen'ev, S.Y. Garmanov, L.S. Shakirova, *J. Anal. Chem.* 56 (2001) 313-323

19. F.R.P. Rocha, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A.S. Lapa, J.L.M. Samos, *Anal. Chim. Acta* 468 (2002) 119-131
20. H. Paseková, M. Polášek, P. Solich, *Chem. Listy* 93 (1999) 354-359
21. N.W. Barnett, C.E. Lenehan, S.W. Lewis, *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 346-353
22. A. Economou, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 416-425
23. D. Šatínský, H.S. Serralheiro, P. Solich, A.N. Araújo, M.C.B.S.M. Montenegro, *Anal. Chim. Acta* 600 (2007) 122-128
24. P.D. Tzanavaras, A. Verdoukas, T. Balloma, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 437-441
25. Z. Legnerová, J. Huclová, R. Thun and P. Solich, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 115-121
26. D. Tomšů, M. Catalá Icardo and J. Martínez Calatayud, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 549-557
27. J. Klimundová, K. Mervartová, H. Sklenářová, P. Solich, M. Polášek, *Anal. Chim. Acta* 573-574 (2006) 366-370
28. S.A. Motz, J. Klimundová, U.F. Schaefer, S. Balbach, T. Eichinger, P. Solich, C.M. Lehr, *Anal. Chim. Acta* 581 (2007) 174-180
29. Z. Holzbecher, J. Churáček a kol., *Analytická chemie*, SNTL-Nakladatelství technické literatury, Praha, 1987
30. W.R.G. Baeyens, D. de Keukeleire, K. Korkidis, *Luminescence techniques in chemical and biochemical analysis*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1991
31. <http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/molspec/lumin1.htm>, Sheffield Hallam University, 24.10.2007
32. F. Li, C. Zhang, X. Guo, W. Feng, *Biomed. Chromatogr.* 17 (2003) 96-105
33. Y. Fuster Mestre, L. Lahuerta, J. Martínez Calatayud, *Luminescence* 16 (2001) 213-235
34. L. Lahuerta Zamora, Y. Fuster Mestre, M.J. Duart, G.M. Antón Fos, R. García Doménech, J. Gálvez Álvarez, J. Martínez Calatayud, *Anal. Chem.* 73 (2001) 4301-4306
35. B. Gómez-Taylor Corominas, G.M. Antón Fos, J.V. García Mateo, L. Lahuerta Zamora, J. Martínez Calatayud, *Talanta* 60 (2003) 623-628

36. E. Polo Merti, M. Catalá Icardo, L. Lahuerta Zamora, G.M. Antón Fos, J. Martínez Calatayud, *Anal. Chim. Acta* 527 (2004) 177-186
37. M. Catala Icardo, L. Lahuerta Zamora, G.M. Antós-Fos, J. Martínez Calatayud, M.J. Duart, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 782-791
38. D. Price, R.F.C. Mantoura, P.J. Worsfold, *Anal. Chim. Acta* 377 (1998) 145-155
39. E.Nalewajko-Sieliwoniuk, J. Nazaruk, E. Antypiuk, A. Kojto, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 579-586
40. M. Tsunoda, K. Imai, *Anal. Chim. Acta* 541 (2005) 13-23
41. K. Mervartová, M. Polášek, J. Martínez Calatayud, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45 (2007) 367-381
42. B.J. Hindson, N.W. Barnett, *Anal. Chim. Acta* 445 (2001) 1-19
43. N.W. Barnett, B.J. Hindson, P. Jones, T.A. Smith, *Anal. Chim. Acta* 451 (2002) 181-188
44. J.L. Adcock, P.S. Francis, N.W. Barnett, *Anal. Chim. Acta* 601 (2007) 36-67
45. A.J. Brown, P.S. Francis, J.L. Adcock, K.F. Lim, *Anal. Chim. Acta* 624 (2008) 175-183
46. F. Nie, J.R. Lu, W.F. Niu, *Anal. Chim. Acta* 545 (2005) 129-136
47. R.D. Gerardi, N.W. Barnett, S.W. Lewis, *Anal. Chim. Acta* 378 (1999) 1-41
48. B.A. Gorman, P.S. Francis, N.W. Barnett, *Analyst* 131 (2006) 616-639
49. A.W. Knight, *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 47-62
50. D. Price, R.F.C. Mantoura, P.J. Worsfold, *Anal. Chim. Acta* 371 (1998) 205-215
51. D. Lannuzel, J. de Jong, V. Schoemann, A. Trevena, J.L. Tison, L. Chou, *Anal. Chim. Acta* 556 (2006) 476-483
52. M. Giroux, F. Brémont, J.P. Salles, E. Rey, J. P. Della Massa, J. Ferrières, *Environ. Int.* 28 (2002) 197-202
53. L Gámiz-Garcia, A.M. García-Campaña, J.J. Soto-Chinchilla, J.F. Huertas-Pérez, A. González-Casado, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 927-942
54. K. Mervartová, M. Catalá Icardo, J. Martínez Calatayud, *Anal. Lett.* 38 (2005) 179-194
55. L.J. Kricka, *Anal. Chim. Acta* 500 (2003) 279-286

56. X.J. Huang, Z.L. Fang, *Anal. Chim. Acta* 414 (2000) 1-14
57. E. Nalewajko, A. Wiszowata, A. Kojto, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 1673-1681
58. J.M. Serrano, M. Silva, *J. Chromatogr. B* 843 (2006) 20-24
59. Y. Zhang, Z. Zhang, Y. Song, Y. Wei, *J. Chromatogr. A* 1154 (2007) 260-268
60. H.N. Choi, S.H. Cho, Y.J. Park, D.W. Lee, W.Y. Lee, *Anal. Chim. Acta* 541 (2005) 49-56
61. J.W. Costin, S.W. Lewis, S.D. Purcel, L.R. Waddell, P.S. Francis, N.W. Barnett, *Anal. Chim. Acta* 597 (2007) 19-23
62. M.T. Tsunoda, E. Uchino, K. Imai, K. Hayakawa, T. Funatsu, *J. Chromatogr. A* 1164 (2007) 162-166
63. Y. Wei, Z.J. Zhang, Y.T. Zhang, Y.H. Sun, *J. Chromatogr. B* 854 (2007) 239-244
64. Y. Zhang, Z. Zhang, Y. Sun, *J. Chromatogr. A* 1129 (2006) 34-40
65. H. Sklenářová, A. Svoboda, P. Solich, M. Polášek, R. Karlíček, *Instrum. Sci. Technol.* 30 (2002) 353-360
66. C.E. Lenehan, N.W. Barnett, S.W. Lewis, *J. Autom. Metod. Manag.* 24 (2002) 99-103
67. A. Economou, D. Papargyris, J. Stratis, *J. Chem. Educ.* 81 (2004) 406-410
68. P. Fletcher, K.N. Andrew, A.C. Calokerinos, S. Forbes, P.J. Worsfold, *Luminiscence* 16 (2001) 1-23
69. P. Solich, H. Sklenářová, M. Polášek, R. Karlíček, *J. Flow Injection Anal.* 18 (2001) 13-19
70. J. Du, L. Shen, J. Lu, *Anal. Chim. Acta* 489 (2003) 183-189
71. J. Huclová, D. Šatínský, H. Sklenářová, R. Karlíček, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 448-454
72. M. Polášek, M. Jambor, *Talanta* 58 (2002) 1253-1261
73. H. Paseková, M. Polášek, J.F. Cigarro, J. Dolejšová, *Anal. Chim. Acta* 438 (2001) 165-173
74. S.M. Sultan, Y.A.M. Hassan, A.M. Abulkibash, *Talanta* 59 (2003) 1073-1080
75. K. Mervartová, M. Polášek, J.M. Calatayud, *Anal. Chim. Acta* 600 (2007) 114-121

76. B.A. Gorman, N.W. Barnett, R. Bos, *Anal. Chim. Acta* 541 (2005) 119-124
77. Z.H. Song, S. Hou, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28 (2002) 683-691
78. F. Wu, J. Lv, *Talanta* 72 (2007) 1811-1817
79. H.C. Yao, X.F. Yang, H. Li, *J. Chin. Chem. Soc.* 54 (2007) 949-956
80. Y. Li, W. Niu, J. Lu, *Talanta* 71 (2007) 1124-1129
81. L. Wang, P. Yang, Y.X. Li, H.Q. Chen, M.G. Li, F.B. Luo, *Talanta* 72 (2007) 1066-1072
82. X.F. Xie, X.D. Sbal, Q.L. Yue, C.H. Huang, Z.H. Song, *Anal. Lett.* 40 (2007) 1951-1961
83. Y. Xiong, H.J. Zhou, Z.J. Zhang, D.Y. He, C. He, *Spectrochim. Acta A* 66 (2007) 341-346
84. D. Nacapricha, P. Sangkarn, C. Karuwan, T. Mantim, W. Waiyawat, P. Wilairat, T. Cardwell, I.D. McKelvie, N. Ratanawimarnwong, *Talanta* 72 (2007) 626-633
85. E. Nalewajko, A. Wiszowata, A. Kojło, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 1673-1681
86. X.D. Shao, X.F. Xie, Z.H. Zhong, *Microchim. Acta* 157 (2007) 159-164
87. G.L. Wei, G. Dang, H. Li, *Luminiscence* 22 (2007) 534-539
88. X.D. Shao, H.Y. Liu, X.F. Gao, W.Q. Chen, Z.H. Song, *Chem. Pap.* 61 (2007) 353-358
89. C.A. Lindino, L.O.S. Bulhões, *Talanta* 72 (2007) 1746-1751
90. J.A. Murillo, A.A. Molina, A.M. de la Pena, I.D. Meras, A.J. Giron, *J. Fluoresc.* 17 (2007) 481-491
91. M.S. Burkhead, H. Wang, M. Fallet, E.M. Gross, *Anal. Chim. Acta* 613, (2008), 152-162
92. B. Rezaei, A. Mokhtari, T. Khayamian, *Ann. Chim.* 97 (2007), 605-614
93. L. Li, H. Sun, *J. Iran. Chem. Soc.* 5 (2008) 140-149
94. H.W. Sun, L.Q. Li, X.Y. Chen, *J. Clin. Lab. Anal.* 21 (2007) 213-219
95. H. Liu, J. Ren, Y. Hao, P. He, Y. Fang, *Talanta* 72 (2007) 1036-1041
96. Y.H. Li, J.R. Lu, *Luminescence* 22 (2007) 326-330
97. Y.F. Zhuang, H.L. Song, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 824-828
98. A. Waseem, M. Yaqoob, A. Nabi, *J. Chin. Chem. Soc.* 54 (2007) 1505-1510
99. B. Li, Q. Deng, C. Xu, *Spectrochim. Acta A* 68 (2007) 510-515

100. G. Lattanzio, A.M. García-Campaña, J.J. Soto-Chinchilla, L. Gámiz-Gracia, S. Girroli, J. Pharm. Biomed. Anal. 46 (2008) 381-385
101. F.E.O. Suliman, M.M. Al-Hinai, S.M.Z. Al-Kindy, S.B. Salama, Talanta 74 (2008) 1256-1264
102. A. Waseem, M. Yaqoob, A. Nabi, Talanta 71 (2007) 56-61
103. A. Waseem, M. Yaqoob, G.M. Greenway, Anal. Lett. 40 (2007) 1071-1083
104. J. Du, L. Hao, Y. Li, J. Lu, Anal. Chim. Acta 582 (2007) 98-102
105. F. Nie, J. Lu, Talanta 74 (2008) 1242-1246
106. G. Wei, C. Wei, G. Wang, H. Yao, H. Li, Anal. Lett. 40 (2007) 2179-2191
107. Q. Jiang, F. Nie, J. Lu, Luminescence 23 (2008) 32-36
108. H. Zhang, F. Nie, J. Lu, Anal. Lett. 40 (2007) 3405-3416
109. Y.-D. Liang, J.-F. Song, M. Xu, Spectrochim Acta A 67 (2007) 430-436
110. B.-T. Zhang, L. Zhao, J.-M. Lin, Talanta 74 (2008) 1154-1159
111. Z.M. Rao, P. Zou, M. Chen, F.R. Xiu, Y.L. Chen, K.J. Hong, Spectrosc. Spect. Anal. 28 (2008) 269-272
112. E. Wolyniec, U. Niedzwiedzka, A. Kojło, Instrum. Sci. Technol. 35 (2007) 219-231
113. M. Timotheou-Potamia, A.C. Calokerinos, Talanta 71 (2007) 208-212
114. Guidance for Industry, Nonsterile Semisolid Dosage Forms, FDA, SUPACC-SS, CMC7 (1997) 19-25
115. W.Y. Lee, T.A. Nieman, Anal. Chim. Acta 334 (1996) 183-191
116. M. Stolarczyk, J. Krzek, W. Rzeszutko, J. AOAC Int. 87 (2004) 592-595
117. Britský lékopis, 2004, The Stationery Office, Londýn, 2004, str.2799
118. Y. Wei, Z. Zhang, Y. Zhang, Y. Sun, Chromatographia 65 (2007) 443-446
119. T. Gamazo Climent, J.R. Albert-García, J. Martínez Calatayud, Anal. Lett. 40 (2007) 629-643
120. B. Gómez-Taylor Corominas, M. Catalá Icardo, L. Lahuerta Zamora, J.V. García Mateo, J. Martínez Calatayud, Talanta (2004) 618-625
121. C.M.P.G. Amorim, J.R. Albert-García, M.C.B.S. Montenegro, A.N. Araújo, J. Martínez Calatayud, J. Pharm. Biomed. Anal. 43 (2007) 421-427