

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI
KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie



Optimalizace SIA stanovení dakarbazinu

Hradec Králové 2010

Markéta Horáková

Prohlášení

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

Poděkování

Chtěla bych tímto poděkovat vedoucí diplomové práce Pharmedr. Haně Sklenářové, PhD. za trpělivost, vstřícnost, cenné rady a odborné vedení při vypracovávání této práce.

Abstrakt

Dakarbazin byl stanovován sekvenční injekční analýzou s chemiluminiscenční detekcí, při reakci vzorku s manganistanem draselným v prostředí kyseliny sírové. Optimalizovány byly objemy činidel, jejich koncentrace, průtoková rychlost, struktura měřicího cyklu. Také byl zkoušen vliv rozpouštědel (voda, 60% etanol, 60% metanol) a zesilovačů chemiluminiscenční reakce (polyfosfát sodný, kyselina mravenčí, glutaraldehyd a formaldehyd). Výslednými optimálními podmínkami byla sekvence: 40 μ l 1 M H_2SO_4 , 3 μ l 10 mM $KMnO_4$, 30 μ l 10 mM roztoku dakarbazinu, 40 μ l 1 M H_2SO_4 , případná aspirace 50 μ l zesilovače. Aspirace roztoků probíhala za průtokové rychlosti 100 μ l/s, promísení a průtoková rychlost transportu do detektoru byla 40 μ l/s, po každém měření byl přidán výplach kyselinou šťavelovou, aby se předešlo usazování $KMnO_4$ v hadičkách. Napětí na fotonásobiči detektoru bylo 420 V. Kalibrační závislosti velikosti CL intenzity na koncentraci dakarbazinu byly nelineární, s možností výběru určité lineární oblasti. Pro roztok dakarbazinu bez zesilovače nebyla lineární oblast nalezena s dostatečně vysokým korelačním koeficientem, pro roztok dakarbazinu s 60% metanolem 0,5 – 10 mmol/l, pro roztok dakarbazinu s 1,39 M kyselinou mravenčí 4 – 10 mmol/l. Detekční limit byl pro roztok dakarbazinu bez zesilovače vypočítán 0,1474 mmol/l, pro roztok dakarbazinu s 60% metanolem 0,2269 mmol/l, pro roztok dakarbazinu s 1,39 M kyselinou mravenčí 0,1077 mmol/l. Kvantifikační limit byl spočítán: 0,4999 mmol/l pro roztok dakarbazinu bez zesilovače, 0,7505 mmol/l pro roztok dakarbazinu s 60% metanolem, 0,3702 mmol/l pro roztok dakarbazinu s 1,39 M kyselinou mravenčí. Opakovatelnost stanovení dakarbazinu byla 2,10% (5 mM roztok) a 3,88% (1 mM) u roztoku dakarbazinu bez zesilovačů; 4,00% (5 mM) a 2,63% (1 mM) u roztoku dakarbazinu s 60% metanolem; 2,22% (5 mM) a 3,08% (1 mM) u roztoku dakarbazinu s 1,39 M kyselinou mravenčí.

Abstract

Dacarbazine was determined by sequential injection analysis with chemiluminescence detection during reaction of sample and KMnO_4 in sulfuric acid. Reagent volumes, their concentrations, flow rate and structure of cycle were optimised. Also the influence of solvents (water, 60% ethanol, 60% methanol) and enhancers of CL reaction (sodium polyphosphate, formic acid, glutaraldehyde and formaldehyde) was tested. Final optimal conditions are: 40 μl 1 M H_2SO_4 , 3 μl 10 mM KMnO_4 , 30 μl 10 mM solution of dacarbazine, 40 μl 1 M H_2SO_4 , eventually aspiration of 50 μl enhancer. Aspiration of the solutions proceeded in flow rate 100 $\mu\text{l/s}$, mixing and flow rate to the detector was 40 $\mu\text{l/s}$. Washing with oxalic acid was used after each measurement cycle to prevent KMnO_4 settling on tubes. Voltage at the photomultiplier of the detector was 420 V. The calibration relations of CL intensity to concentration of the samples were nonlinear with possibility of selection of linear areas. The linear area for the solution of dacarbazine without enhancers wasn't found with correlation coefficient high enough, for the solution of dacarbazine with 60% methanol was 0.5 – 10 mmol/l, for the solution of dacarbazine with 1.39 M formic acid 4 – 10 mmol/l. Limit of detection for the solution of dacarbazine without enhancers was 0.1474 mmol/l, for the solution of dacarbazine with 60% methanol 0.2269 mmol/l, for the solution of dacarbazine with 1.39 M formic acid 0.1077 mmol/l. Quantitation limit was calculated as 0.4999 mmol/l for the solution of dacarbazine without enhancers, 0.7505 mmol/l for the solution of dacarbazine with 60% methanol, 0.3702 mmol/l for the solution of dacarbazine with 1.39 M formic acid. Repeatability of dacarbazine determination was 2.10% (5 mM solution) and 3.88% (1 mM) at the solution of dacarbazine without enhancers; 4.00% (5 mM) and 2.63% (1 mM) at the solution of dacarbazine with 60% methanol; 2.22% (5 mM) and 3.08% (1 mM) at the solution of dacarbazine with 1.39 M formic acid.

Obsah

1	Úvod a cíl práce	8
2	Teoretická část	9
2.1	Dakarbazin	9
2.2	Sekvenční injekční analýza	13
2.2.1	Princip SIA	13
2.2.2	Klasický SIA systém	14
2.3	Chemiluminiscence	16
2.3.1	Typy chemiluminiscence	16
2.3.1.1	Podle postupu měření v průtokovém systému.....	16
2.3.1.2	Podle druhu chemiluminiscenčního procesu.....	18
2.4	Manganistan draselný jako chemiluminiscenční činidlo.....	19
2.4.1	Reakční podmínky.....	20
2.4.1.1	Koncentrace KMnO_4	20
2.4.1.2	Složení prostředí	21
2.4.2	Zesilovače.....	22
2.4.3	Analyty	23
2.4.4	Analytické aplikace CL reakce s KMnO_4	25
2.4.4.1	Farmaceutické a klinické aplikace	25
2.4.4.2	Aplikace v životním prostředí a zemědělství	26
2.4.4.3	Potravinové a konzumní zboží.....	26
3	Experimentální část	27
3.1	Použitá zařízení	27
3.2	Použité chemikálie	29
3.2.1	Základní a pracovní roztoky	29
3.3	Optimalizace metody.....	33
3.3.1	Optimalizace jednotlivých parametrů	33
3.3.1.1	Koncentrace a objemy činidel.....	33
3.3.1.2	Rychlost průtoku	34
3.3.1.3	Struktura měřicího cyklu	34
3.3.1.4	Použitá rozpouštědla.....	34

3.3.1.5	Zesilovače signálu	34
3.4	Kalibrační závislosti	35
3.5	Opakovatelnost.....	35
3.6	Základní parametry.....	35
4	Výsledky a diskuse.....	37
4.1	Optimalizace metody.....	37
4.1.1	Výsledky optimalizace	37
4.1.1.1	Koncentrace a objemy činidel.....	37
4.1.1.2	Rychlost průtoku	42
4.1.1.3	Struktura měřicího cyklu	43
4.1.1.4	Vliv rozpouštědel.....	43
4.1.1.5	Zesilovače signálu	44
4.2	Kalibrační závislosti	47
4.2.1	Kalibrační závislost dakarbazinu za standardních podmínek.....	47
4.2.2	Kalibrační závislost dakarbazinu v 60% metanolu	49
4.2.3	Kalibrační závislost dakarbazinu v prostředí kyseliny mravenčí	51
4.2.4	Srovnání rozsahů jednotlivých kalibrací a jejich lineárních oblastí	53
4.3	Opakovatelnost.....	54
4.3.1	Opakovatelnost za standardních podmínek.....	54
4.3.2	Opakovatelnost v 60% metanolu	55
4.3.3	Opakovatelnost s 1,39 M kyselinou mravenčí	55
4.4	Souhrn	58
5	Závěr	61
6	Seznam obrázků a tabulek.....	62
7	Seznam zkratk	64
8	Seznam použité literatury	65

1 Úvod a cíl práce

Sekvenční injekční analýza je jednou z moderních průtokových metod. Vyznačuje se vysokou rychlostí analýzy, automatizací a jednoduchostí ovládání. V poslední době se často kombinuje s chemiluminiscenční detekcí. Pro stanovení velkého počtu látek je pro chemiluminiscenční reakci užívána oxidace manganistanem draselným v kyselém prostředí, která je použita i v této práci.

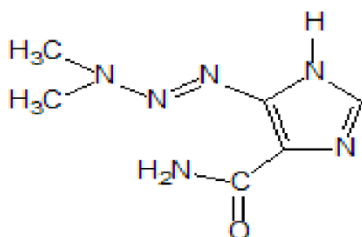
Cílem práce bylo optimalizovat stanovení dakarbazinu sekvenční injekční analýzou s chemiluminiscenční detekcí, dále otestovat vliv rozpouštědel a zesilovačů CL, zjistit kalibrační rozsahy, limity detekce a kvantifikace a opakovatelnost.

2 Teoretická část

2.1 Dakarbazin

ČL 2009 – evropská část – Dacarbazinum $C_6H_{10}N_6O$ Mr 182,18

Je to 5-[(1E)-3,3-dimethyltriaz-1-en-1-yl]-1H-imidazol-4-karboxamid.



Obrázek 1: Dakarbazin

Dakarbazin (DTIC) je nízkomolekulární sloučenina syntetizovaná v roce 1962 Shealym a spol. V témže roce byla zjištěna jeho účinnost u četných experimentálních nádorů. Pro nespolehlivou resorpci z trávicího ústrojí se podává výhradně nitrožilně [1].

Je alkylačním činidlem na bázi imidazolu v latentní formě, která se v organismu aktivuje metabolickou přeměnou za uvolnění diazomethanu. Pro určitou podobnost se strukturou purinových bází se u dakarbazinu předpokládá i antimetabolické působení [2].

Metabolizuje se částečně, v nezměněné formě se vyloučí ledvinami asi 50% podaného množství. Na plazmatické proteiny se váže pouze 20%. Poločasy se prodlužují při poruše jaterních funkcí, neboť při metabolickém odbourávání hraje významnou úlohu mikrosomální systém jaterních buněk. Hematoencefalickou bariérou proniká jen malá část podané dávky [1].

Vlastnosti a skladování

Je to bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek. Těžce rozpustný ve vodě a v bezvodém etanolu, prakticky nerozpustný v dichlormethanu. Skladuje se při teplotě 2 °C až 8 °C, za chránění před světlem [3].

Zkoušky totožnosti

Ke zkouškám totožnosti se používá:

- A. Absorpční spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti se spektrálním rozmezím mezi 200 - 400 nm. Absorpčním maximem je 323 nm. Prodleva se vyskytuje při 275 nm. Specifická absorbance v absorpčním maximu je 1024 až 1131.
- B. Infračervená absorpční spektrofotometrie, ve které dochází k porovnání vzorku s dakarbazinem CRL.
- C. Tenkovrstvá chromatografie, kde stacionární fází je deska s vrstvou silikagelu F₂₅₄ pro TLC R. Mobilní fází tvoří směs objemových dílů kyseliny octové ledové R, vody R a butan-1-olu R (1+2+5). Nanáší se 10 µl, vyvíjí se do 2/3 desky, suší se na vzduchu a detekuje se v UV světle při 254 nm. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku má odpovídat polohou a velikostí hlavní skvrně na chromatogramu porovnávacího roztoku (dakarbazin CRL).

Zkoušky na čistotu

Ke zkouškám na čistotu patří:

vzhled roztoku, kde se pomocí roztoku kyseliny citronové monohydrátu R (210 g/l) stanovuje, zda je roztok čirý (2.2.1) a není zbarven intenzivněji než porovnávací barevný roztok HŽ₆ (2.2.2., Metoda II).

příbuzné látky:

A. Kapalinová chromatografie

Použijí se čerstvě připravené roztoky za chránění před světlem. Použitá kolona je 250 mm dlouhá s vnitřním průměrem 4,5 mm. Stacionární fází je silikagel pro chromatografii oktadecylsilylovaný R (5 μ m). Jako mobilní fáze se použije roztok natrium-dioctylsulfosukcinátu R (2,33 g/l) v roztoku kyseliny octové ledové R (15,63 g/l). Protože mobilní fáze obsahuje natrium-dioctylsulfosukcinát, musí se denně čerstvě připravovat a kolona se musí nejméně 2 h po skončení všech zkoušek nebo na konci dne promývat směsí stejných objemových dílů metanolu R a vody R. Nastříkuje se 25 μ l zkoušeného a porovnávacího roztoku (a). Průtoková rychlost je 1,2 ml/min, detekce se provádí pomocí spektrofotometrického detektoru při 254 nm. Doba záznamu má být trojnásobkem retenčního času nečistoty A (retenční čas nečistoty A je asi 3 min).

B. Kapalinová chromatografie popsaná ve zkoušce A na příbuzné látky s následujícími úpravami:

Mobilní fáze je směsí objemových dílů roztoku natrium-dioctylsulfosukcinátu R (2,33 g/l) v roztoku kyseliny octové ledové R (15,63 g/l) a metanolu R (45 + 55). Nastříkuje se 10 μ l zkoušeného a porovnávacího roztoku (b). Doba záznamu je dvojnásobkem retenčního času dakarbazinu. Relativní retence je vztažena k dakarbazinu (retenční čas asi 12 min). Nečistota B má mít relativní retenci asi 0,7.

Nečistota D. Head-space plynová chromatografie

Použije se 30,0 m dlouhá kolona z taveného křemene s vnitřím průměrem 0,53 mm. Stacionární fází je polyethylenglykol deaktivovaný pro bazické látky R (tloušťka filmu 1,0 μ m), nosným plynem je helium pro chromatografii R. Chromatografie probíhá rychlostí 13 ml/min. Dělicí poměr je 1 : 1.

Mohou se použít statické head-space podmínky: kde teplota ustavování rovnováhy je 60 °C; délka ustavování rovnováhy je 10 min; teplota převodové kapiláry je 90 °C; doba tlakování je 30 s.

K detekci se použije plamenoionizační detektor. Nastříkuje se 1 ml.

Voda, semimikrostanovení vody (2.5.12). Má být nejvýše 0,5%; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Síranový popel (2.4.14). Má být nejvýše 0,1%; stanoví se s 1,00 g zkoušené látky.

Stanovení obsahu

Pro stanovení obsahu se 0,150 g rozpustí ve 30 ml kyseliny octové bezvodé R a titruje se kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS za potenciometrické indikace bodu ekvivalence (2.2.20).

1 ml kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS odpovídá 18,22 mg $C_6H_{10}N_6O$ [3].

Jiná stanovení dakarbazinu

Mezi jiná stanovení dakarbazinu patří vysoce účinná kapalinová chromatografie a kapilární elektroforéza.

V HPLC metodě byl stanoven dakarbazin ve směsi s 5 % dextrózou. Separace a kvantifikace probíhala na 22 cm silikagelové koloně za běžné teploty okolí, mobilní fáze se skládala z 6,25 mM fosfátového pufru a acetonitrilu o pH 3 v poměru 60:40, s průtokovou rychlostí 1 ml/min a detekcí při 216 nm. Separace probíhala do deseti minut, s citlivostí v řádu ng/ml. Převládajícím mechanismem retence analytů byla výměna kationtů. Lineární závislost pro dakarbazin se pohybovala v rozsahu 0,79-7,9 µg/ml. Správnost a přesnost se pohybovala v rozmezí 0-7% a 0,4-6%. Detekční limit byl 12,5 ng/ml [4].

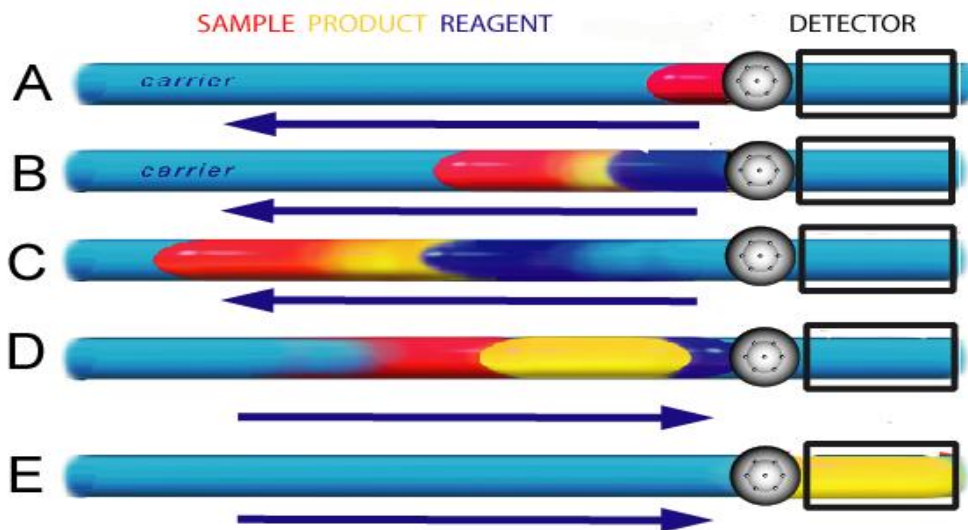
Při stanovení dakarbazinu kapilární elektroforézou byla použita silikagelová kapilára (70 cm x 50 µm) s elektrolytovým pufrem z metanolu a fosfátového pufru (0,025 M, pH 4) v poměru 2:98, při napětí 15 kV a detekcí při 220 nm. Bohužel v CE nemohly být stanoveny nečistoty, protože při vysoké koncentraci pík dakarbazinu překryl píky nečistot. Proto byla použita izokratická separace HPLC na avidin proteinové koloně s mobilní fází 2-propanol:fosfátový pufr (pH 7, 0,02 M) 4:96, průtokovou rychlostí 0,6 ml/min a detekcí při 230 nm. Lineární oblast dakarbazinu se pohybovala mezi 15-25 µg/ml s korelačním koeficientem vyšším než 0,998 [5].

2.2 Sekvenční injekční analýza

Sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis, SIA) patří do skupiny průtokových analytických technik, které umožňují racionalizovat a automatizovat složité postupy při analýze velkých sérií vzorků instrumentálními metodami, a tak podstatným způsobem zvyšovat produktivitu zejména rutinních stanovení [6]. Jedná se o druhou generaci průtokových technik, která je založena na programovatelném průtoku [7].

2.2.1 Princip SIA

SIA používá programovatelný, dvousměrný přerušovaný tok, přesně řízený počítačem. Vzorek (obr.č. 2A červená) a činidla (obr.č. 2B modrá) jsou postupně aspirovány pomocí vícecestného selekčního ventilu (MPV) do nosného proudu, který je poháněn pístovou pumpou umístěnou proti ventilu. Reakční produkt (obr.č. 2C žlutá) se začne tvořit na rozhraní obou zón. Obrácení toku (obr.č. 2D, E) slouží k další podpoře promíchání a dopravě reakční směsi do detektoru. Protože pohyb zón je řízen počítačem, časový interval mezi aspirací vzorku (obr.č. 2A) a detekcí produktu (obr.č.2E) je výborně opakovatelný. Tímto způsobem jsou všechny vzorky zpracované stejným způsobem, což umožňuje jejich porovnávání [8].

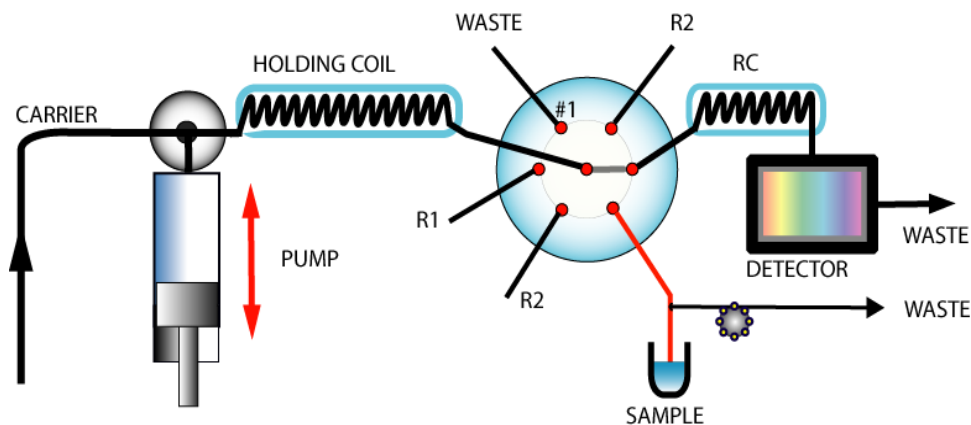


Obrázek 2: Pořadí kroků SIA měření [8]

2.2.2 Klasický SIA systém

Skládá se z dvousměrné pístové pumpy, mísící cívky, vícecestného selekčního ventilu, reakční cívky (RC) a detektoru [7].

Ventil, který má šest pozic, umožňuje použití až tří činidel (R1, R2, R3), v praxi spíše 4, protože port pro pomocný odpad není nutný. Vysoká přesnost pumpy je dána použitým převodem mezi krokovým motorem a pístem pumpy. Krokový motor je dále spolu s vícecestným selekčním ventilem řízen počítačem a specializovaným softwarem. Programování toku spolu s přímým přístupem k roztoku vzorku a činidla poskytované vícecestným selekčním ventilem přináší univerzálnost, protože všechny parametry – aspirace vzorku, disperze roztoků a načasování kroků měřicího cyklu jsou řízeny úpravou softwaru bez nutnosti fyzické rekonfigurace systému [8-9].



Obrázek 3: Uspořádání klasického SIA systému [8]

Carrier – nosný proud, holding coil – mísící cívka, pump – pumpa, waste – odpad, sample – vzorek, RC – reakční cívka, detector – detektor.

Tento model převládal v technice SI do té doby, než trend miniaturizace dovedl k vývoji microSI-lab-on-valve systém. Nevýhodou konvenční sestavy proti konstrukci microSI je větší vnitřní objem, nicméně běžné SI systémy jsou i nadále široce používány v kombinaci s vnějšími zařízeními, jako jsou přímo přístupné odtahové digestoře, dialyzátory, odsiřovací zařízení apod., kde vnitřní objem průtokové cesty nemůže být zmenšen, a když vnější detektory jsou objemné a nemohou být integrovány do ventilu [8-9].

2.3 Chemiluminiscence

Chemiluminiscence (CL) je proces produkující elektromagnetické (ultrafialové, viditelné nebo infračervené) záření jako důsledek chemické reakce, ve které se jeden z produktů nachází v excitované formě a záření vysílá při přechodu do svého původního stavu.

Na rozdíl od spektrofotometrie a fluorimetrie se CL vyznačuje nízkou hladinou šumu, nižšími detekčními limity a širší lineární oblastí. Mimoto nepřítomnost světelného excitačního zdroje vedla ke snížení ceny a k tvorbě cenově dostupného a jednoduchého přístroje [10].

Některé nedostatky CL jsou podobné ostatním spektrofotometrickým metodám např. limitovaná selekční schopnost založena na faktu, že většina CL činidel reaguje pozitivně na skupiny podobných sloučenin spíše než na jednotlivé analyty. Další nevýhodou je nutnost kontroly faktorů prostředí, protože CL se při malé změně prostředí může změnit.

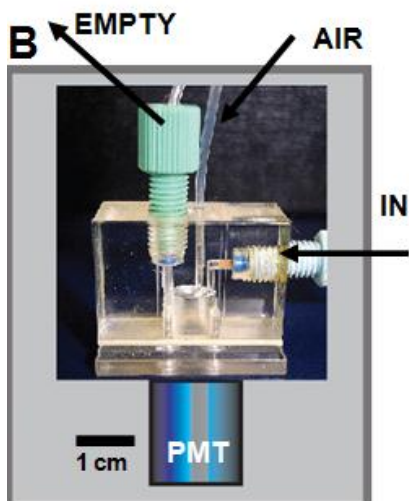
Chemiluminiscenční detekce je používána v mnoha oborech jako např. životní prostředí, medicína, farmacie, potravinářství a další [10].

2.3.1 Typy chemiluminiscence

2.3.1.1 Podle postupu měření v průtokovém systému

a) Batch-flow metoda (dávkovací metoda)

Vzorky a činidla se převedou do mísící cívky, mezi jednotlivými zónami je vzduch. Poté se rychle transportují do měřicí cely, kde jsou promíchány vzduchem, a reakce je zahájena. CL se měří do úplného skončení emise záření, pak je objem cely odstraněn vysátím [9]. U této metody je těžké dosáhnout rychlého, efektivního mísení a proces nejde jednoduše automatizovat [10].



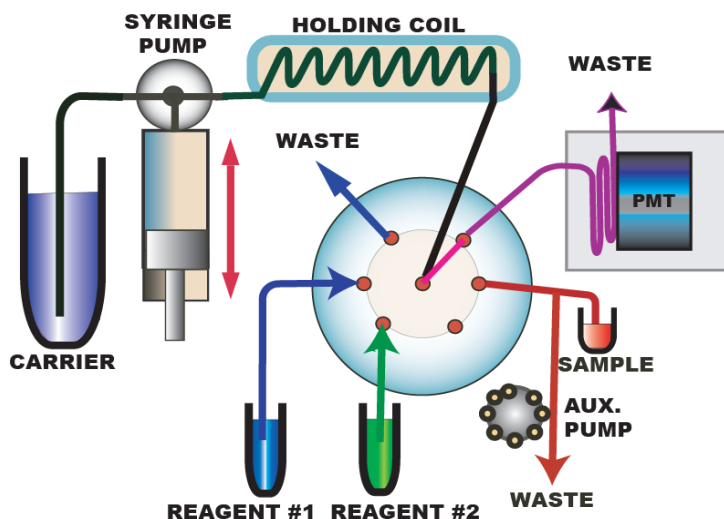
Obrázek 4: Batch-flow metoda [8]

In – vstup vzorku a činidel, air – přívod vzduchu, empty – vyprázdnění cely,

PMT – fotonásobičový detektor.

b) Průtokový systém

Je reprezentovaný FIA a SIA technikami, analyty jsou aspirovány kontinuálně (FIA) nebo v předprogramovaných změnách toku (SIA) do detektoru, kde se detekuje CL záření. Na rozdíl od batch techniky má průtokový systém několik výhod: větší rychlost analýzy, možnost přípravy nestabilního činidla přímo v soustavě, automatizace a snížená spotřeba vzorku a činidel. Charakteristickým znakem FIA a SIA je automatické, účinné a opakovatelné mísení malých objemů vzorků a činidel. Jestliže mísení probíhá co nejbližší k detekčnímu okénku fotonásobiče, lze zaznamenat i velmi rychlou CL reakci [10].



Obrázek 5: Průtokový systém SIA [8]

Carrier – nosný proud, syringe pump – pístová pumpa, holding coil – mísící cívka, waste – odpad, reagent – činidlo, sample – vzorek, PMT – fotonásobičový detektor.

2.3.1.2 Podle druhu chemiluminiscenčního procesu

a) Nepřímé CL metody

V nepřímých analýzách analyt pouze ovlivňuje indikátor CL reakce a hraje roli inhibitoru nebo senzitizeru. Typické nepřímé analýzy jsou založeny na oxidaci luminolu, lucigeninu, lophinu a siřičitanu [10].

b) Přímé CL metody

V přímých metodách je CL záření uvolňováno díky přímé reakci analytu a CL činidla (obvykle se jedná o redoxní reakce). CL činidlo je obecně silným nebo středně silným oxidantem jako manganistan draselný, komplex tris(2,2'-bipyridin)ruthenia(III), hexakvanoželezitan draselný, N-bromsukcinimid a další. CL záření může být obvykle zesíleno použitím katalyzátoru, ovlivněním složení prostředí a zesilovači [10].

2.4 Manganistan draselný jako chemiluminiscenční činidlo

Navzdory širokému použití KMnO_4 jako chemiluminiscenčního činidla, mechanismus reakce a emitující částice ještě nebyly zcela objasněny. Bylo ověřeno, že spektrální rozlišení chemiluminiscence KMnO_4 je jednotný pás s pevným maximem mezi 610 nm a 750 nm a že záření má červenou barvu. Existují doklady o tom, že emitující částicí jsou Mn^{2+} ionty. Tyto důkazy mohou být shrnuty následovně:

- ve většině případů je spektrální rozložení nezávislé na analytu
- Mn(II) je známý produkt reakce
- chemiluminiscence je podobná fosforescenci (${}^4\text{T}_1 \rightarrow {}^6\text{A}_1$) Mn(II) v roztoku při nízké teplotě ve fosfátovém skle
- opravené CL spektrum reakce KMnO_4 při pokojové teplotě odpovídá CL spektru reakcí s Mn(IV) a Mn(III)

Ve všech případech byla stanovena vlnová délka maxima záření na 734 ± 5 nm (nebo 689 ± 5 nm jestliže byl použit hexametfosforečnan sodný) [11].

Dále bylo zjištěno, že NaF inhibuje produkci CL záření - tvoří stabilní komplex s Mn(III) , který vzniká jako meziprodukt během CL reakce. V malém množství prací byl Mn(III) uznán jako emitující částice, ale pro toto tvrzení nejsou žádné spektroskopické důkazy a zdá se to nepravděpodobné, protože reakce mezi Mn(III) a boritanem sodným ukazuje to samé záření, které je pozorováno u redukce KMnO_4 v kyselém prostředí.

Navzdory silným důkazům, že emitující částicí je Mn(II) , červené světlo vznikající při CL reakci je často přisuzováno O_2 . Tato částice vzniká při jiných dobře známých CL reakcích – H_2O_2 s chloristanem sodným. Při této reakci je také produkováno červené záření se spektrálním rozložením ve viditelné oblasti (intenzivní pásmo v 633 nm a 703 nm – což je od CL KMnO_4 rozdílné). O_2 emituje záření i v infračervené oblasti, které v reakcích s KMnO_4 nebylo zjištěno [11].

CL KMnO_4 v kyselém prostředí není jednoznačně ovlivněna koncentrací rozpuštěného kyslíku ani azidem sodným a histidinem, které emisi O_2 zhašejí. Produkce O_2 jako meziproduktu nebo emitující částice by neměla být brána jako součást reakce KMnO_4 , ale získávají se nové chemické a spektroskopické důkazy, aby toto tvrzení podložily.

Dalšími předpokládanými emitujícími částicemi v reakcích s KMnO_4 jsou oxidační produkty, zvláště ty fluorescentní. Jiné tvrzení zahrnuje energetickou přeměnu z vysoce energetického stavu meziproduktu na fluorescentní sloučeninu (analyty a zesilovače přidávané do roztoku), které potom emitují světlo. Obecně tato tvrzení nejsou založena na spektroskopických důkazech, ale na druhou stranu mnoho studií ukazuje, že mnoho reakcí mezi KMnO_4 a fluorescentními sloučeninami vyvolávají charakteristický pás červeného záření. Proto ve většině reakcí s KMnO_4 je nejpravděpodobnější, že CL vychází z elektronicky excitovaného Mn(II) [11].

Avšak jsou některé výjimky, ve kterých se zaznamenalo jiné CL spektrum záření. Např. reakce siloxanu s KMnO_4 vykazovala žluté záření a redukce následující po oxidaci Ru(bipy)_3^{2+} KMnO_4 zase vyvolala záření oranžové.

CL vycházející z reakcí KMnO_4 se siřičitanem, thiosíranem a dalšími podobnými sloučeninami může mít odlišné spektrální složení, než jaké má Mn(II) , a jeví se jako nezávislá na oxidačním činidle. Pro zvýšení CL intenzity byly použity různé organické částice a jiné oxidanty. V případě fluorescentních částic (jako je riboflavin) se ukazuje, že emise ne vždy odpovídá charakteristické fluorescenci přidávaných senzitizerů. Také bylo vyzkoušeno několik nefluorescentních sloučenin. Pro lepší pochopení reakcí je potřeba další výzkum [11].

2.4.1 Reakční podmínky

2.4.1.1 Koncentrace KMnO_4

Nejčastěji používanou koncentrací KMnO_4 je 0,1 mM – 1,0 mM, ale používají se i koncentrace nižší než 0,01 mM nebo vyšší než 25 mM. V určitém bodě závisí na přístrojových i chemických podmínkách, intenzita CL již neroste se zvyšující se

koncentrací KMnO_4 , ale je pozorováno její snižování. Mnoho výzkumníků přisuzovalo tento efekt absorbovat emitující záření silně zbarvenému oxidantu. Avšak spektra absorpce KMnO_4 a CL záření se jen velmi málo překrývají. Snižování intenzity záření vyplývající ze samotné absorpce emitovaného světla KMnO_4 by se vyskytovalo až při mnohem vyšších koncentracích KMnO_4 než byly zkoumány. Zvyšování koncentrace KMnO_4 způsobuje zvýšení rychlosti reakce až do rozsahu, kdy hlavní emise proběhne dříve, než se směs dostane do místa detekce. Také bylo naznačeno, že klesající odpověď při vysoké koncentraci KMnO_4 je způsobena neradiační deexcitací [11].

2.4.1.2 Složení prostředí

Použití KMnO_4 v CL reakcích bylo zahájeno v alkalickém prostředí, ale charakteristická červená CL je pozorována pouze v kyselých podmínkách. Reakční kinetika a intenzita CL jsou závislé na koncentraci a typu kyseliny. Ukazuje se, že optimální podmínky závisí na faktorech, jako je přístrojové uspořádání a chemická struktura analytu. Nejvíce se používá kyselina sírová. Je přidávána do činidel, nosiče i vzorků nejčastěji v koncentracích 0,1 M až 2,0 M. Dále se používají kyselina chlorovodíková, dusičná, orthofosforečná nebo chloristá v podobných koncentracích. Relativně málo pokusů na zvýšení CL signálu zahrnovalo kyselinu polyfosforečnou, která se ukázala jako jednoznačný zesilovač signálu. Naneštěstí je ve vodě nestabilní, měření s ní má špatnou opakovatelnost a vysoký šum v CL odezvě. Rychlost hydrolyzy se dá snížit pomocí úpravy pH roztoku na 2 pomocí NaOH. Podobný zesilující účinek má i polyfosfát sodný (0,5-1%), který se používá u mnoha CL reakcí s KMnO_4 . Hodnota pH roztoku se pohybuje mezi 2 – 4 za použití kyseliny sírové nebo o-fosforečné. Toto pH odpovídá koncentraci kyseliny sírové od 0,5 mM do 6,5 mM, což je mnohem méně než optimální koncentrace kyseliny bez použití tohoto zesilovače [11].

Bylo zjištěno, že vliv teploty (nad 90°C) zvyšuje intenzitu záření. Tento efekt je obecně přičítán většině reakcí zrychlujících se se zvýšenou teplotou, což je podpořeno silným spojením mezi intenzitou záření, teplotou a průtokovou rychlostí. Zatímco vyšší teplota může zlepšit intenzitu záření, zároveň toto zesílení může snížit opakovatelnost a způsobit vzrůst šumu.

Jestliže je CL s KMnO_4 v kyselém prostředí použita k detekci u HPLC, má výběr mobilní fáze dramatický dosah na CL odpověď. Acetonitril jednoznačně zhasí CL odpověď analytu a navíc v kombinaci s KMnO_4 může vznikat kyanovodík. Metanol je mnohem více používaný. Bylo zjištěno, že metanol může způsobit jak inhibici, tak i zesílení CL odpovědi v závislosti na koncentraci metanolu a analytu. Podobný efekt byl pozorován i u etanolu, propanolu a isopropanolu. Stupeň zhasení se snižuje od metanolu k propanolu [11].

2.4.2 Zesilovače

Výzkum enhancerů byl zaměřen na polyfosfáty, nízkomolekulární aldehydy, ionty kovů, fluorescentní sloučeniny a surfaktanty.

Použití polyfosfátů (polyfosfát sodný, hexametafosfát sodný, kyselina tetrafosforečná a polyfosforečná) zvyšuje intenzitu záření v reakcích s KMnO_4 . Polyfosforečná kyselina zvyšuje signál 4 – 10krát více než kyselina sírová a hexametafosfát sodný v roztoku o pH 2 s kyselinou sírovou zvyšuje signál 50krát v porovnání s dihydrogen o-fosfátem sodným při stejném pH. Mechanismus zesílení pravděpodobně zahrnuje stabilizaci reakčních meziproductů. Stabilita mangan-polyfosfátových komplexů stoupá s prodloužením polyfosfátového řetězce. Posun vlnové délky maxima z 734 ± 5 na 689 ± 5 nm při použití polyfosfátů dokazuje, že došlo buď ke změně prostředí, nebo charakteru Mn(II) zářiče [11].

Nízkomolekulární aldehydy zvyšují intenzitu CL u mnoha analytů, ale také reagují s činidly a produkují vlastní záření. Používá se formaldehyd (v koncentraci 0,4 M – 2,0 M), kyselina mravenčí, glyoxal a glutaraldehyd. Bylo detekováno zvýšení CL intenzity až o dva řády, ale v některých případech bylo zvýšení znegováno doprovodným zvýšením slepého signálu nebo zářením pozadí. Glutaraldehyd je méně toxickou alternativou formaldehydu a navíc je vhodným zesilovačem pro stanovení sulfonamidů. Další zesilovače jsou druhořadé, na rozdíl od formaldehydu a kyseliny mravenčí. Mechanismus zesílení pomocí těchto látek ještě nebyl plně objasněn. Některé vědecké

skupiny tvrdí, že tyto látky jsou oxidovány do formy CO_2^* , O_2 nebo neznámých meziproductů, které emitují záření nebo převádějí energii na další zářiče. Ale experimentální důkazy Mn(II) jako zářiče a identifikace spektrálního složení v přítomnosti i nepřítomnosti formaldehydu toto nepotvrdili. Jiné skupiny tvrdí, že tyto zesilovače zvyšují rychlost oxidace analytu. Reakce mezi KMnO_4 a kyselinou mravenčí je autokatalyzována jak koloidním oxidem manganičitým (reakční meziproduct) tak i Mn(II) (produkt reakce) [11].

Bylo testováno velké množství kovových iontů, ale jako zesilovač se používá pouze Fe(II). Bylo zjištěno, že přidáním Fe(II) se zvýší rychlost CL oxidace kyseliny mravenčí a etanolu s KMnO_4 v kyselém prostředí.

Fluorescenty (rhodamin B, rhodamin G, chinin a fluorescein) a surfaktanty (sodium dodecylsulfát, TritonX-100, cetyltrimethylbromid amonný) byly také testovány jako zesilovače, ale jen u několika z nich byl nalezen pozitivní výsledek. Mimo to oxidace siřičitanu KMnO_4 a dalšími oxidanty, je zesilována mnoha fluorescenty a nefluorescenty, včetně některých surfaktantů.

Dalšími sloučeninami používanými k zesílení CL intenzity u reakcí s KMnO_4 jsou H_2O_2 a β -cyklodextrin [11].

2.4.3 Analyty

Je složité porovnávat CL intenzitu a detekční limity analytů z různých studií vzhledem k jejich širokému rozsahu podmínek, ale vyvinulo se několik vztahů mezi strukturou stanovované látky a intenzitou CL. Morfin je jednou z prvních sloučenin, která byla stanovována CL reakcí s KMnO_4 . Byly zkoušeny i jiné látky, ale žádná nebyla zkoumána v tak nízkých koncentracích jako morfin. Srovnání CL odpovědí morfinu a dalších opioidních alkaloidů bylo odhaleno, že sloučeniny obsahující fenol a furanový můstek mají největší CL odpověď po oxidaci KMnO_4 v kyselém prostředí.

Fenolům se dostalo větší pozornosti než ostatním sloučeninám používaným v CL reakcích s KMnO_4 v kyselém prostředí. Bylo zjištěno, že polyfenoly a dihydroxybenzeny mají větší CL odpověď než jednoduché fenoly. Ale vliv počtu a pozice substituentů nebyl jasně stanoven. Byly předkládány výsledky s různými závěry, pravděpodobně záleží na přístrojových a chemických podmínkách [11].

S KMnO_4 v kyselém prostředí byly dále detekovány indoly, včetně alkaloidů a biogenních aminů. Vyšší odpověď pocházela od indolů, které obsahovaly elektron donorovou skupinu ($-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$) na benzenovém kruhu. Detekční limity u hydroxy substituovaných indolů jsou obecně vyšší než u jejich methoxy analogů. Funkční skupina umístěná na C_3 také může mít určitý efekt.

Zkoumány byly i heterocykly neobsahující fenol a indol (peniciliny, cefalosporiny, fenothiaziny apod.). Vzhledem k jejich komplikované struktuře a limitovanému srovnání ve stejných podmínkách, je těžké stanovit, která funkční skupina zodpovídá za intenzivní záření. Silnou odpověď s KMnO_4 v kyselém prostředí vykazují některé organické kyseliny jako kyselina askorbová a jablečná [11].

Objevilo se několik strategií, jak rozšířit CL detekci po reakci s KMnO_4 v kyselém prostředí. Degradace zásaditým roztokem nebo UV zářením může jednoznačně zvýšit odpověď mnoha analytů. Detekce založená na CL reakci KMnO_4 se siřičitanem má jinou selektivitu než samotná přímá reakce s KMnO_4 .

Z kovů jsou Sn(II) a As(III) jediné, které jsou určovány CL reakcí s KMnO_4 v kyselém prostředí. Jejich detekční limity jsou mnohem lepší než u většiny organických analytů s tímto činidlem [11].

2.4.4 Analytické aplikace CL reakce s KMnO_4

2.4.4.1 *Farmaceutické a klinické aplikace*

CL reakce s KMnO_4 v kyselém prostředí se používá k detekci opioidních alkaloidů v průmyslových procesech, léčiv v komerčních přípravcích, biomolekul, léčiv a metabolitů v biologických tekutinách, nelegálních drog v soudních vzorcích.

K CL stanovování opioidních alkaloidů se používá FIA a SIA, bez předchozí úpravy vzorků vzhledem k selektivitě činidla a zanedbatelné koncentraci interferujících částic. U vzorků se směsí analytů, u kterých je požadována fyzikální separace, se používá kapilární elektroforéza a HPLC s KMnO_4 CL detekcí [11].

Stanovování léčiv v komerčních přípravcích je nejčastěji navrhovanou aplikací CL s KMnO_4 . Léčiva, která mohou být tímto způsobem stanovena, zahrnují peniciliny, cefalosporiny, sulfonamidy, aminobenzoáty, fenothiaziny, pyrazolony a další [11].

V mnoha případech je vzorek matrice relativně jednoduchý a činidlo dostatečně selektivní ke spolehlivému stanovení pomocí FIA a SIA. Nicméně bez separačních kroků (chromatografie a kapilární elektroforéza) není možnost stanovení nečistot a tak je nepravděpodobné, že by se průtokové metody staly metodou první volby ve zjišťování kvality ve farmaceutickém průmyslu. Avšak pro jejich vysokou výkonnost mohou hrát důležitou roli v monitorování a zjišťování doby použitelnosti přípravků. FIA s CL detekcí je používána k určování mnoha léčiv a biomolekul v moči a krvi, což se ukazuje jako využitelné v post-column detekci těchto analytů [11].

Několik HPLC metod s post-column CL detekcí s KMnO_4 bylo vyvinuto pro stanovení biomolekul a léčiv v biologických tekutinách (morfin, heroin, neurotransmitterové metabolity v moči, methylthiouracil, propylthiouracil v séru) [11].

Další využití souvisí s použitím FIA s přímou fotodegradací vzorků před KMnO_4 CL detekcí pro stanovení sulfonamidů. UV ozáření zvýšilo citlivost 10krát.

CL s KMnO_4 v kyselém prostředí byla také použita ve studiu interakcí mezi léčivými a proteiny ke zjištění farmakokinetických a farmakodynamických vlastností. Stanovované léčivo bylo opakovaně získáváno ze směsi mikrodialýzou a ultrafiltrací [11].

2.4.4.2 Aplikace v životním prostředí a zemědělství

Zde se používá CL s KMnO_4 v kyselém prostředí ke stanovení oxidu siřičitého ve vzduchu, pesticidů a herbicidů (akrolein, aldikarb, bromoxynil, propanil, karbofuran, fenoly a další anorganické sloučeniny) v neupravené vodě, solích, obilí atd. Průtokové metody byly použity u vzorků se známým složením nebo u jednotlivých částic, které vyvolávají CL s KMnO_4 v kyselém prostředí. U vzorků obsahujících více sloučenin je nutná separace [11].

2.4.4.3 Potravinové a konzumní zboží

Byla popsána batch metoda pro stanovení etanolu v ginu, KMnO_4 v kyselém prostředí není příliš selektivní k tomuto analytu, ale koncentrace etanolu vymezená na etiketách výrobků byla mezi 40 a 47,3%. Vzorky nebyly ředěny a výsledky se pohybovaly v mezích lišících se o 1,1% od vyznačených hodnot. Tento postup se však nedá úspěšně aplikovat na pivo a víno. Na víno byla zkoušená FIA ke stanovení fenolů nebo antioxidační aktivity vína. Výhodná se jevila spíše pro červené víno než pro bílé [11].

Ke stanovení kyseliny askorbové v džusech a vitamínových přípravcích se používá FIA metoda, která se používá rovněž ke stanovení kyseliny jablečné. Naneštěstí se tyto kyseliny často vyskytují v koncentracích, které brání selektivnímu stanovení každé z nich.

Užitím HPLC s post-column CL detekcí byla stanovena tři tetracyklinová antibiotika v medu. Potom třeba arbutin a kyselina L-askorbová v bělicí kosmetice po extrakci metanolem [11].

3 Experimentální část

3.1 Použitá zařízení

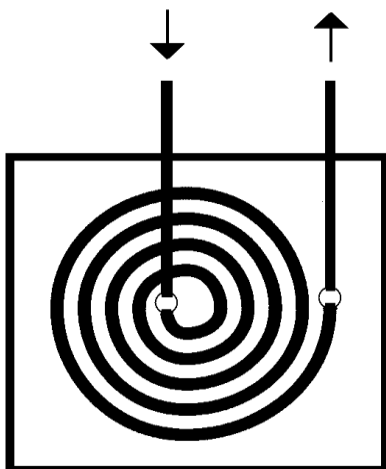
1. Analytické váhy SARTORIUS 2004 MP
2. Počítač se speciálními kartami AT-MIO-16E10 a AT-23214 a programovacím prostředím LabVIEW (National Instruments Corporation, USA)
3. Ovládací program FaFSIA vytvořený na Katedře analytické chemie
4. Pístové čerpadlo Cavro XL 3000 s objemem 2,5 ml (Cavro Scientific Instruments Inc. USA)
5. Deseticestný selekční ventil VICI VALCO (Valco Instruments Co. Inc., USA)
6. Mísicí cívka o objemu 1,2 ml z teflonové (PTFE) hadičky o průměru 0,75 mm
7. Fluorimetrický průtokový detektor model FS 970 (Schoeffel Instruments, USA)
8. Spojovací materiál – hadičky z teflonu (PTFE) o vnitřním průměru 0,50 a 0,75 mm (Watrex, Česká republika)

Přístroje č. 2-8 byly součástí sestavy průtokového systému SIA.

SIA systém se skládal z jednobanální vysoce přesné obousměrné pumpy, mísicí cívky, vícecestného ventilu a průtokového detektoru. Systém byl plněn nosným proudem, ve kterém byly zóna vzorku a zóny činidel postupně aspirovány do mísicí cívky, kde vytvořily lineární vrstvy. Tyto vrstvy měly parabolický tvar, způsobený rozdíly mezi průtokovými rychlostmi přiléhajících zón v průřezu hadičky průtokového systému. Změny směru toku a jeho zrychlení způsobily promíchání jednotlivých zón mezi sebou. Vícecestný ventil byl potom přepnut do pozice portu spojeného s detektorem, směr toku se obrátil a přenesl zóny vzorku, činidel a vznikajícího produktu reakce do průtokové cely [12].

Použitý fluorimetr byl upraven pro chemiluminiscenci tak, že bylo vypnuto jeho primární záření a v místě sekundárního filtru byl vložen chemiluminiscenční modul.

Tento modul obsahoval stočenou spirálu z průhledné teflonové hadičky o vnitřním průměru 0,50 mm, pětkrát stočené. Zóny vzorku, činidel a vznikajícího produktu reakce byly z vícecestného ventilu transportovány do středu spirály, následně do vnějších částí spirály a ven do odpadu.



Obrázek 6: Chemiluminiscenční modul

Napětí na fotonásobiči fluorimetrického detektoru bylo po celou dobu měření 420 V.

3.2 Použité chemikálie

- Dacarbazine, Sigma-Aldrich Praha, ČR
- Manganistan draselný, Balex Pardubice – Rosice n.L., ČR
- Kyselina sírová 96% p.a., Lachema Neratovice, ČR
- Kyselina mravenčí 85-87%, Lachema Neratovice, ČR
- Methanol p.a., Lachema Neratovice, ČR
- Ethanol 96%, denatur. methanolem, Lihovar Pardubice, ČR
- Glutaraldehyd 25% vodný roztok, Reanal, Maďarsko
- Formaldehydi solutio 35%, Lachema Neratovice, ČR
- Kyselina šťavelová dihydrát p.a., Lachema Neratovice, ČR
- Polyfosfát sodný, Sodium polyphosphate, crystals + 80 MESH, 96 %, Sigma-Aldrich Praha, ČR

3.2.1 Základní a pracovní roztoky

Všechny základní roztoky byly uchovávány v chladu, roztok manganistanu draselného i v temnu. Základní roztok dakarbazinu byl před měřením připravován vždy čerstvý. Pracovní roztoky byly připravovány v čas potřeby. Bylo zjištěno a následně i nalezeno v literatuře [13], že dakarbazin se rozkládá na světle a vychytává se na skleněný povrch odměrných nádob. Z tohoto důvodu byly roztoky připravovány pomocí plastového odměrného nádobí vyrobeného z materiálu PMP.

❖ Roztoky základních činidel:

- Zásobní roztok dakarbazinu 10 mM - navážka 0,0182 g doplněna vodou do 10 ml.
- Zásobní roztok manganistanu draselného 10 mM – navážka 0,0395 g doplněna vodou do 25 ml.
- Zásobní roztok kyseliny sírové 2,5 M byl k dispozici.

- Zásobní roztok kyseliny sírové 1 M – 10 ml 2,5 M kyseliny sírové doplněno vodou do 25 ml.
- Zásobní roztok kyseliny šťavelové 0,5 M – navážka 1,5759 g doplněna vodou do 25ml.
- Pracovní roztoky manganistanu draselného byly připraveny naředěním zásobního roztoku manganistanu draselného 10 mM vodou do 10 ml odměrné baňky.

Tabulka 1: Ředění zásobního roztoku manganistanu draselného

Koncentrace pracovního roztoku manganistanu draselného [mmol/l]	Objem zásobního roztoku manganistanu draselného 10 mM [ml]
0,1	0,1
1	1,0
10	10,0

- Pracovní roztoky kyseliny sírové byly připraveny naředěním zásobního 2,5 M roztoku kyseliny vodou do 10 ml odměrné baňky.

Tabulka 2: Ředění zásobního roztoku kyseliny sírové

Koncentrace pracovního roztoku kyseliny sírové [mol/l]	Objem zásobního roztoku kyseliny sírové 2,5 M [ml]
0,5	2
1	4
1,5	6
2	8

- Pracovní roztoky dakarbazinu byly připraveny naředěním základního roztoku dakarbazinu 10 mM do 10 ml odměrné baňky.

Tabulka 3: Ředění zásobního roztoku dakarbazinu

Koncentrace pracovního roztoku dakarbazinu [mmol/l]	Objem zásobního roztoku dakarbazinu 10 mM [ml]
10	10,0
7	7,0
5	5,0
1	1,0
0,5	0,5
0,4	0,4
0,3	0,3
0,1	0,1

❖ **Roztoky zesilovačů :**

- Zásobní roztok glutaraldehydu 0,255 M – 2,4 ml glutaraldehydu 25% vodný roztok doplněno vodou do 25 ml odměrné baňky.
- Pracovní roztoky glutaraldehydu byly připraveny naředěním zásobního roztoku 0,255 M glutaraldehydu vodou do 10 ml odměrné baňky.

Tabulka 4: Ředění zásobního roztoku glutaraldehydu

Koncentrace pracovního roztoku glutaraldehydu [mol/l]	Objem zásobního roztoku glutaraldehydu 0,255 M [ml]
0,255	10
0,127	5
0,025	1

- Zásobní roztok kyseliny mravenčí 1,739 M – 0,767 ml kyseliny mravenčí 85-87% doplněno vodou do 10 ml odměrné baňky.
- Pracovní roztoky kyseliny mravenčí byly připraveny naředěním zásobního roztoku 1,739 M kyseliny mravenčí vodou do 10 ml odměrné baňky.

Tabulka 5: Ředění zásobního roztoku kyseliny mravenčí

Koncentrace pracovního roztoku kyseliny mravenčí [mol/l]	Objem zásobního roztoku kyseliny mravenčí 1,739 M [ml]
0,435	2,5
0,870	5,0
1,130	6,5
1,304	7,5
1,391	8,0
1,478	8,5
1,565	9,0

- Pracovní roztok 60% metanolu – 6 ml metanolu doplněno vodou do 10 ml odměrné baňky.
- Pracovní roztok 60% etanolu – 6,25 ml etanolu 96% denatur. metanolem doplněno vodou do 10 ml odměrné baňky.
- Pracovní roztok formaldehydu 0,375 M – 0,28 ml formaldehydu 35% doplněno vodou do 10 ml odměrné baňky.
- Pracovní roztok 2 % polyfosfátu sodného – 0,2024 g polyfosfátu sodného doplněno vodou do 10 ml odměrné baňky.

3.3 Optimalizace metody

Optimalizace metody byla vypracována pro nalezení vhodných podmínek ke stanovení dakarbazinu sekvenční injekční analýzou a zajištění co nejlepší odezvy detektoru a opakovatelnosti výsledků. Základem stanovení je oxidační reakce dakarbazinu s manganistanem draselným v kyselém prostředí.

Optimalizované parametry:

- rychlost průtoku
- objemy činidel (manganistan draselný, kyselina sírová)
- koncentrace činidel (manganistan draselný, kyselina sírová)
- struktura měřicího cyklu
- použitá rozpouštědla
- zesilovače signálu

3.3.1 Optimalizace jednotlivých parametrů

K optimalizaci byl použit 10 mM roztoku dakarbazinu v dávkovaném objemu 30 μl . Měření bylo prováděno vždy třikrát a uváděná výsledná hodnota byla průměrem.

3.3.1.1 Koncentrace a objemy činidel

Byly hledány nejvhodnější hodnoty koncentrace činidel (manganistanu draselného, kyseliny sírové) a jejich aspirovaných objemů, při kterých by odezva detektoru byla nejvyšší.

Tabulka 6: Rozsah koncentrací a dávkovaných objemů činidel

Činidlo	Aspirovaný objem [μl]	Koncentrace [mol/l]
Manganistan draselný	2 - 50	$1 \cdot 10^{-3} - 10 \cdot 10^{-3}$
Kyselina sírová	10 - 60	0,5 - 2

3.3.1.2 *Rychlost průtoku*

Byly testovány různé hodnoty průtokové rychlosti a vyhledána ta, při které byla odezva detektoru nejvyšší. Rozmezí testovaného parametru bylo 30 – 100 $\mu\text{l/s}$.

3.3.1.3 *Struktura měřicího cyklu*

Cílem bylo najít nejvhodnější pořadí kroků, při kterých by bylo stanovení dakarbazinu nejcitlivější a zároveň dostatečně opakovatelné. Byly vyzkoušeny různé objemy, pořadí a promísení činidel.

3.3.1.4 *Použitá rozpouštědla*

Byl testován vliv rozpouštědel, ve kterých byl připraven pracovní roztok dakarbazinu (voda, 60% etanol, 60% metanol).

3.3.1.5 *Zesilovače signálu*

S cílem zvýšit intenzitu signálu bylo vyzkoušeno použití zesilovačů signálu (polyfosfát sodný, kyselina mravenčí, glutaraldehyd, formaldehyd).

Tabulka 7: Rozmezí koncentrací zesilovačů

Zesilovač	Koncentrace [mol/l]
Kyselina mravenčí	0,435 – 1,565
Glutaraldehyd	0,025 – 0,255
Formaldehyd	0,375
Zesilovač	Koncentrace [%]
Polyfosfát sodný	2

3.4 Kalibrační závislosti

Kalibrační závislosti byly proměřeny:

- za standardních podmínek (bez zesilovačů)
- v prostředí 60 % metanolu
- s 1,39 M kyselinou mravenčí jako zesilovačem

Byl zjištěn typ kalibrační závislosti, kvantifikační a detekční limity.

3.5 Opakovatelnost

Opakovatelnost byla proměřena:

- za standardních podmínek (bez zesilovačů)
- v prostředí 60 % metanolu
- s 1,39 M kyselinou mravenčí jako zesilovačem

Byl zjištěn průměr, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka.

3.6 Základní parametry

Základní podmínky pro měření:

Napětí na fotonásobiči: 420 V

Rozsah: 0,01-0,5 μA

Základní struktura měřicího cyklu:

aspirace 3 μ l 10 mM manganistanu draselného

aspirace 30 μ l 10 mM roztoku dakarbazinu

aspirace 40 μ l 1 M kyseliny sírové

aspirace roztoků probíhala průtokovou rychlostí 100 μ l/s

transport do detektoru

průtoková rychlost pro transport do detektoru 50 μ l/s

propláchnutí 0,5 M kyselinou šťavelovou

4 Výsledky a diskuse

4.1 Optimalizace metody

Optimalizace měla za cíl nalezení vhodných podmínek pro stanovení dakarbazinu sekvenční injekční analýzou pomocí chemiluminiscenční detekce.

4.1.1 Výsledky optimalizace

4.1.1.1 Koncentrace a objemy činidel

Tabulka 8: Objem 10 mM manganistanu draselného

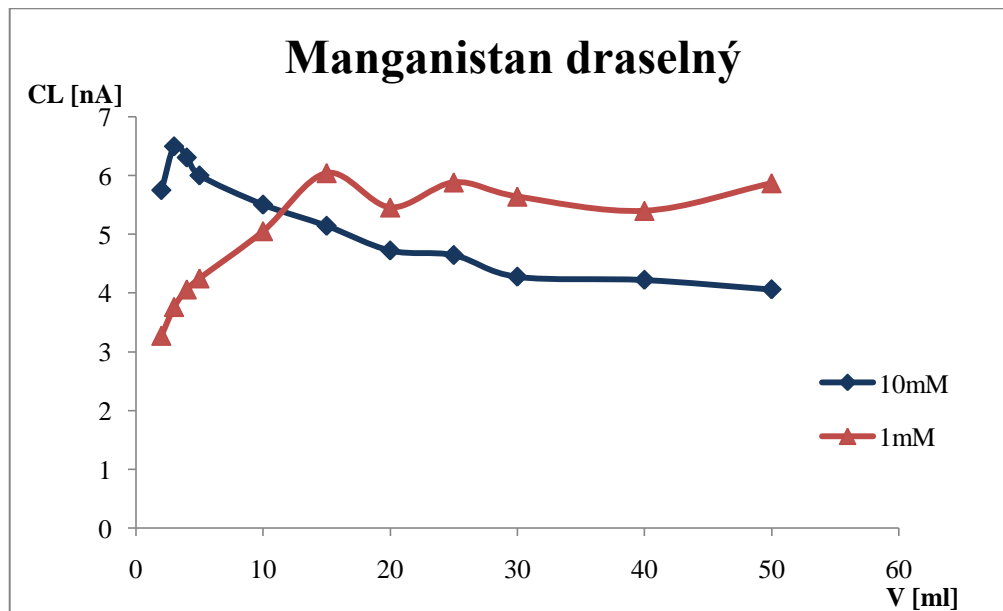
Objem činidla [μl]	Výška píku	Intenzita CL[nA]
2	0,7188	5,750
3	0,8120	6,496
4	0,7883	6,306
5	0,7500	6,000
10	0,6879	5,503
15	0,6427	5,142
20	0,5902	4,722
25	0,5805	4,644
30	0,5345	4,276
40	0,5277	4,222
50	0,5075	4,060

Citlivost detektoru: 0,02 μA .

Tabulka 9: Objem 1 mM manganistanu draselného

Objem činidla [μ l]	Výška píku	Intenzita CL[nA]
2	0,4096	3,277
3	0,4706	3,765
4	0,5079	4,063
5	0,5312	4,250
10	0,6314	5,051
15	0,7545	6,036
20	0,6816	5,453
25	0,7348	5,878
30	0,7046	5,637
40	0,6744	5,395
50	0,7330	5,864

Citlivost detektoru: 0,02 μ A.



Obrázek 7: Vliv dávkovaného objemu manganistanu draselného na intenzitu chemiluminiscenčního signálu

Podle naměřených hodnot bylo nejlepší použití 10 mM manganistanu draselného o objemu 3 μl .

Tabulka 10: Objem 0,5 M kyseliny sírové o koncentraci

Objem činidla [μl]	Výška píku	Intenzita CL[nA]
20	0,2172	1,738
30	0,3173	2,538
40	0,3698	2,958
50	0,3884	3,107
60	0,4496	3,597
70	0,4822	3,858

Citlivost detektoru: 0,02 μA .

Tabulka 11: Objem 1 M kyseliny sírové o koncentraci

Objem činidla [μl]	Výška píku	Intenzita CL[nA]
10	0,0932	1,864
20	0,1447	2,894
30	0,1976	3,952
40	0,2588	5,176
50	0,2826	5,652
60	0,2924	5,848
70	0,2981	5,962
80	0,3181	6,362

Citlivost detektoru: 0,05 μA .

Tabulka 12: Objem 1,5 M kyseliny sírové o koncentraci

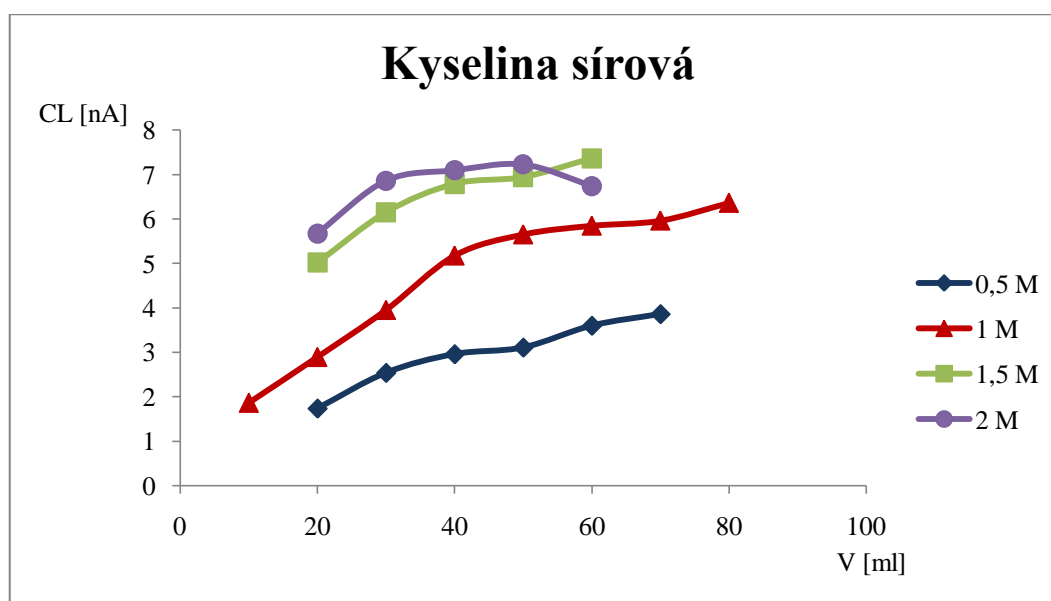
Objem činidla [μl]	Výška píku	Intenzita CL[nA]
20	0,2510	5,020
30	0,3077	6,154
40	0,3396	6,792
50	0,3472	6,944
60	0,3683	7,366

Citlivost detektoru: 0,05 μA .

Tabulka 13: Objem 2 M kyseliny sírové o koncentraci

Objem činidla [μl]	Výška píku	Intenzita CL[nA]
20	0,2838	5,676
30	0,3431	6,862
40	0,3548	7,096
50	0,3613	7,226
60	0,3372	6,744

Citlivost detektoru: 0,05 μA .



Obrázek 8: Vliv dávkovaného objemu kyseliny sírové na intenzitu chemiluminiscenčního signálu.

Nejlepší signál byl získán s užitím kyseliny sírové o koncentraci 1 M a 1,5 M. Optimální objemy obou koncentrací kyseliny jsou poměrně velké, takže bylo vyzkoušeno rozdělení celkového objemu do dvou menších zón:

- 80 μ l kyseliny sírové 1 M rozdělených do dvou 40 μ l
- 60 μ l kyseliny sírové 1,5 M rozdělených do dvou 30 μ l

Tabulka 14: Rozdělené objemy kyseliny sírové 1 M a 1,5 M

		Výška signálu	Slepý signál	Po odečtení sl. signálu	CL [nA]
80 μ l 1 M kyseliny sírové	MKDK	0,4492	0,072	0,3772	7,544
	KMDK	0,5304	0,060	0,4704	9,408
60 μ l 1,5 M kyseliny sírové	MKDK	0,3613	0,072	0,2893	5,786
	KMDK	0,4801	0,060	0,4201	8,402

Citlivost detektoru: 0,05 μ A.

MKDK – činidla v pořadí: manganistan draselný, kyselina sírová, dakarbazin, kyselina sírová

KMDK - činidla v pořadí: kyselina sírová, manganistan draselný, dakarbazin, kyselina sírová

Vyšší signál po odečtení slepého signálu byl získán s 1 M kyselinou sírovou rozdělenou do dvou 40 μ l objemů v pořadí činidel KMDK.

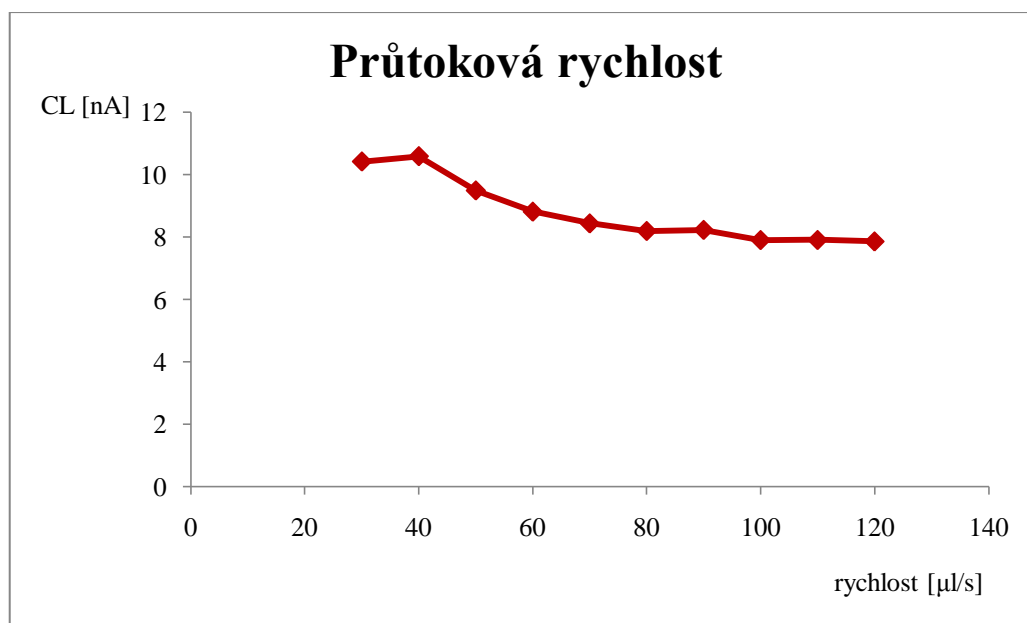
Výsledek: dále byly používány 3 μ l 10 mM roztoku manganistanu draselného a 80 μ l (rozdělených do 2 x 40 μ l) 1 M kyseliny sírové.

4.1.1.2 Rychlost průtoku

Tabulka 15: Velikost odezvy v závislosti na rychlosti průtoku

Průtoková rychlost [$\mu\text{l/s}$]	Výška píku	Intenzita CL [nA]
120	0,3930	7,860
110	0,3953	7,906
100	0,3952	7,904
90	0,4114	8,228
80	0,4097	8,194
70	0,4218	8,436
60	0,4406	8,812
50	0,4745	9,490
40	0,5293	10,586
30	0,5208	10,416

Citlivost detektoru: $0,05 \mu\text{A}$.



Obrázek 9: Vliv průtokové rychlosti na intenzitu chemiluminiscenčního signálu.

Před testováním průtokových rychlostí byl zjištěn nárůst chemiluminiscenčního signálu při promíchání aspirovaných zón změnou směru toku nosného proudu (byl testován pouze jeden krok mísení, protože použitá reakce probíhá velmi rychle). Hodnoty průtoku v tabulce č. 15 byly získány při tomto zlepšeném promísení zón. Nejlepší hodnota průtokové rychlosti byla 40 $\mu\text{l/s}$, která byla použita pro další experimenty.

4.1.1.3 Struktura měřícího cyklu

Výsledná struktura měřícího cyklu je:

- aspirace 40 μl 1 M kyseliny sírové
- aspirace 3 μl 10 mM manganistanu draselného
- aspirace 30 μl 10 mM roztoku dakarbazinu
- aspirace 40 μl 1 M kyseliny sírové
- případná aspirace 50 μl zesilovače
- aspirace roztoků probíhala za průtokové rychlosti 100 $\mu\text{l/s}$
- promísení
- transport do detektoru
- průtoková rychlost pro transport do detektoru 40 $\mu\text{l/s}$
- aspirace 0,5 M kyseliny šťavelové
- propláchnutí systému kyselinou šťavelovou

4.1.1.4 Vliv rozpouštědel

S cílem zjistit, které rozpouštědlo by bylo nejlepší pro zvýšení chemiluminiscenčního signálu roztoku dakarbazinu, byla použita tři rozpouštědla – destilovaná voda, 60% metanol a 60% etanol. Při měření 10 mM roztoku dakarbazinu byly získány následující výsledky:

Tabulka 16: Použitá rozpouštědla

Rozpouštědlo	Výška signálu	Slepý signál	Po odečtení sl. signálu	CL [nA]
voda	0,4818 ^a	0,0200 ^a	0,4618 ^a	9,236
60% metanol	0,8426 ^b	0,2683 ^c	0,7085 ^b	56,680
60% etanol	0,4904 ^d	0,3476 ^d	0,1428 ^d	28,560

Citlivost detektoru: ^a – 0,05 μ A; ^b – 0,2 μ A; ^c – 0,1 μ A; ^d – 0,5 μ A

Jako nejlepší rozpouštědla byla vybrána voda a 60% metanol, protože ve srovnání s destilovanou vodou se zvýšil signál šestkrát. 60% etanol sice také zvýšil signál, ale měl ve srovnání s metanolem vysokou hodnotu signálu slepého roztoku.

4.1.1.5 Zesilovače signálu

Byly testovány látky, které by mohly zvýšit signál dakarbazinu ve vodném prostředí. Výběr látek byl převzat z odborné literatury, kde byly popsány jako zesilovače u jiných chemiluminiscenčních stanovení [11]. V této práci byl testován vliv polyfosfátu sodného, kyseliny mravenčí, glutaraldehydu a formaldehydu.

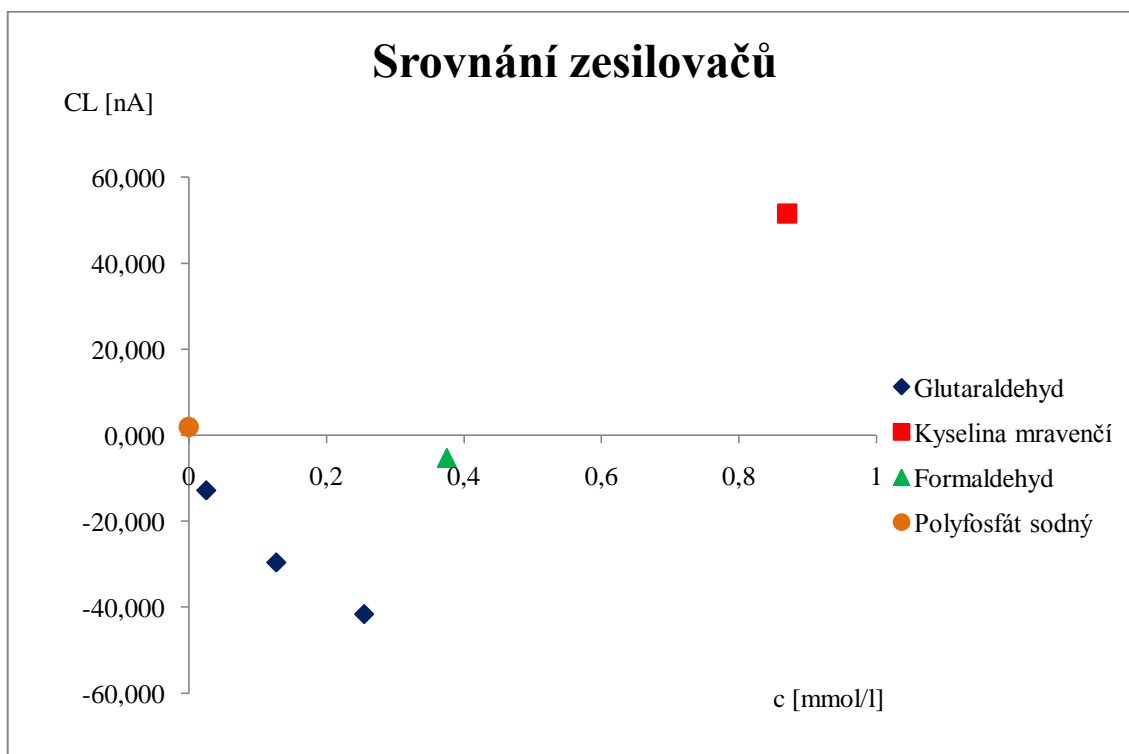
Výsledky:

- 2 % roztok polyfosfátu sodného – výška signálu po odečtení signálu slepého vzorku je 0,2417 při citlivosti detektoru 0,02 μ A

Tabulka 17: Použité zesilovače

Zesilovač	Koncentrace [mmol/l]	Výška signálu	Slepý signál	Po odečtení sl. signálu	CL [nA]
Formaldehyd	0,375	0,8019 ^c	0,8281 ^c	-0,0262 ^c	-5,204
Glutaraldehyd	0,025	0,3529 ^b	0,6756 ^b	-0,3227 ^b	-12,908
Glutaraldehyd	0,127	0,3136 ^a	0,6845 ^a	-0,3709 ^a	-29,672
Glutaraldehyd	0,255	0,4633 ^a	0,9844 ^a	-0,5211 ^a	-41,688
Kyselina mravenčí	0,870	0,6450^a	0,2100^b	0,6450^a	51,600

Citlivost detektoru: ^a – 0,2 μA ; ^b – 0,1 μA ; ^c – 0,5 μA



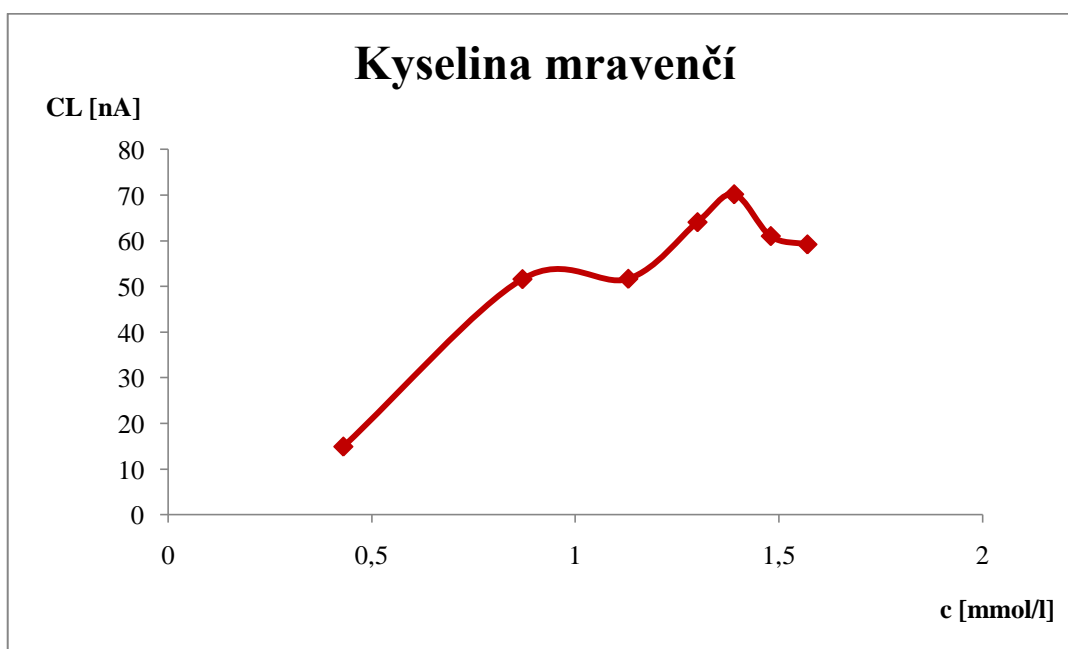
Obrázek 10: Porovnání vlivu zesilovačů chemiluminiscenčního signálu.

Podle výsledků testu byla nejlepším zesilovačem signálu kyselina mravenčí. Proto byly vyzkoušeny různé koncentrace této kyseliny uvedené v následující tabulce.

Tabulka 18: Kyselina mravenčí jako zesilovač

Koncentrace kyseliny mravenčí [mmol/l]	Výška signálu	Slepý signál	Po odečtení sl. Signálu	CL [nA]
0,43	0,8743 ^b	0,2602 ^c	0,3721 ^b	14,884
0,87	0,7500 ^a	0,2100 ^b	0,6450 ^a	51,600
1,13	0,7396 ^a	0,1875 ^b	0,6459 ^a	51,672
1,30	0,9061 ^a	0,2100 ^b	0,8011 ^a	64,088
1,39	1,0070^a	0,2589^b	0,8776^a	70,208
1,48	0,8830 ^a	0,2400 ^b	0,7630 ^a	61,040
1,57	0,8616 ^a	0,2429 ^b	0,7402 ^a	59,216

Citlivost detektoru: ^a – 0,2 μA ; ^b – 0,1 μA ; ^c – 0,05 μA



Obrázek 11: Vliv koncentrace kyseliny mravenčí na chemiluminiscenční signál.

Nejvýraznější zvýšení chemiluminiscenčního signálu bylo získáno s 1,39 M kyselinou mravenčí.

4.2 Kalibrační závislosti

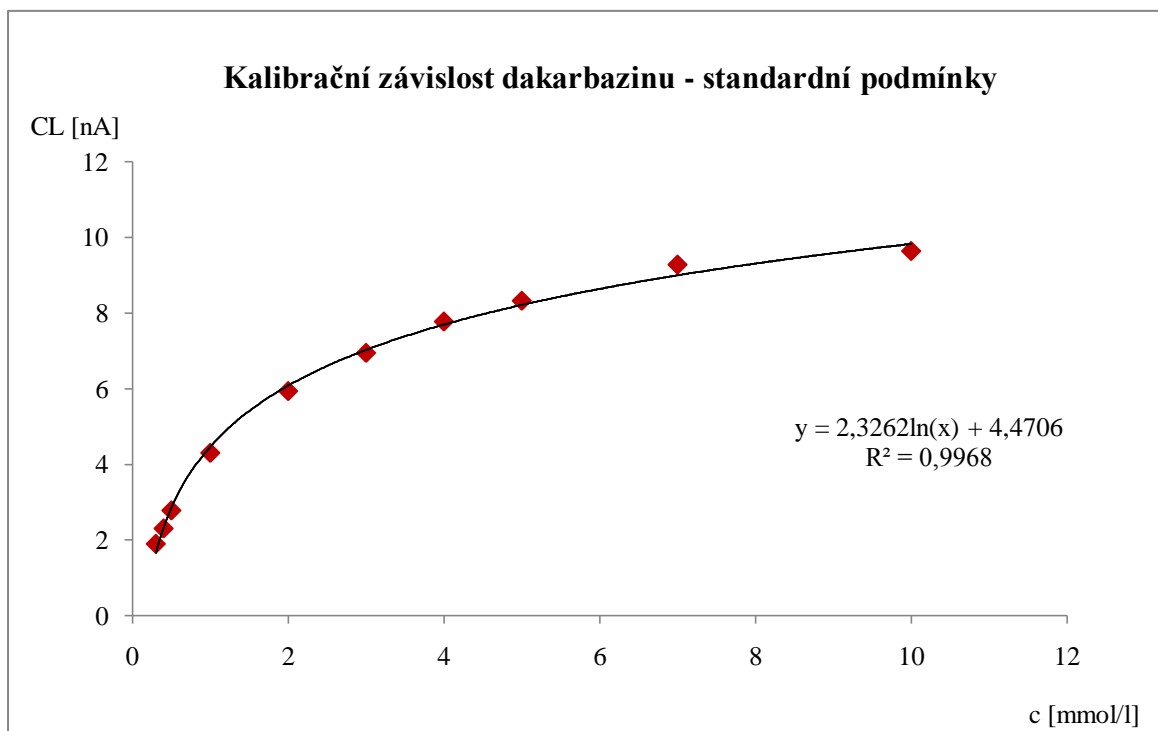
4.2.1 Kalibrační závislost dakarbazinu za standardních podmínek

Byla proměřena kalibrační závislost dakarbazinu bez zesilovačů podle optimalizovaného měřicího cyklu.

Tabulka 19: Kalibrační závislost dakarbazinu - standardní podmínky

Koncentrace [mmol/l]	Ø výška píku	Hodnota CL [nA]
10,0	0,4818 ^a	9,636
7,0	0,4638 ^a	9,277
5,0	0,4161 ^a	8,322
4,0	0,3887 ^a	7,773
3,0	0,3473 ^a	6,945
2,0	0,2968 ^b	5,936
1,0	0,5379 ^b	4,303
0,5	0,3478 ^b	2,783
0,4	0,2883 ^b	2,306
0,3	0,4750 ^c	1,900
0,0	0,0200 ^a	0,400

Citlivost detektoru: ^a - 0,05 μA , ^b - 0,02 μA , ^c - 0,01 μA .



Obrázek 12: Kalibrační závislost dakarbazinu – standardní podmínky

Kalibrační závislost roztoku dakarbazinu za standardních podmínek je logaritmického tvaru.

Její rovnice a korelační koeficient byly vypočítány:

$$y = 2,3262\ln(x) + 4,4706$$

$$R^2 = 0,9968$$

Lineární oblast s dostatečně vysokým korelačním koeficientem nebyla nalezena, pro kalibraci se použije logaritmická kalibrační závislost.

Hodnota detekčního limitu byla vypočtena z velikosti slepého signálu a velikosti šumu: velikost slepého byla změřena při 420 V a citlivosti detektoru 0,05 μA jako hodnota 0,02; to odpovídá velikosti chemiluminiscence 0,40 nA. Velikost šumu byla změřena při 420 V a citlivosti detektoru 0,01 μA jako hodnota 0,06, což je 0,24 nA.

Detekční limit je součtem 3-násobku šumu + slepý signál, tedy $(0,24 \times 3) + 0,40 = 1,12$ nA. Kvantifikační limit je součtem 10-ti násobku šumu + slepý signál,

tedy $(0,24 \times 10) + 0,40 = 2,80$ nA.

Hodnota detekčního limitu se rovná $1,12$ nA $\sim 0,1474$ mmol/l, velikost kvantifikačního limitu je $2,80$ nA $\sim 0,4999$ mmol/l.

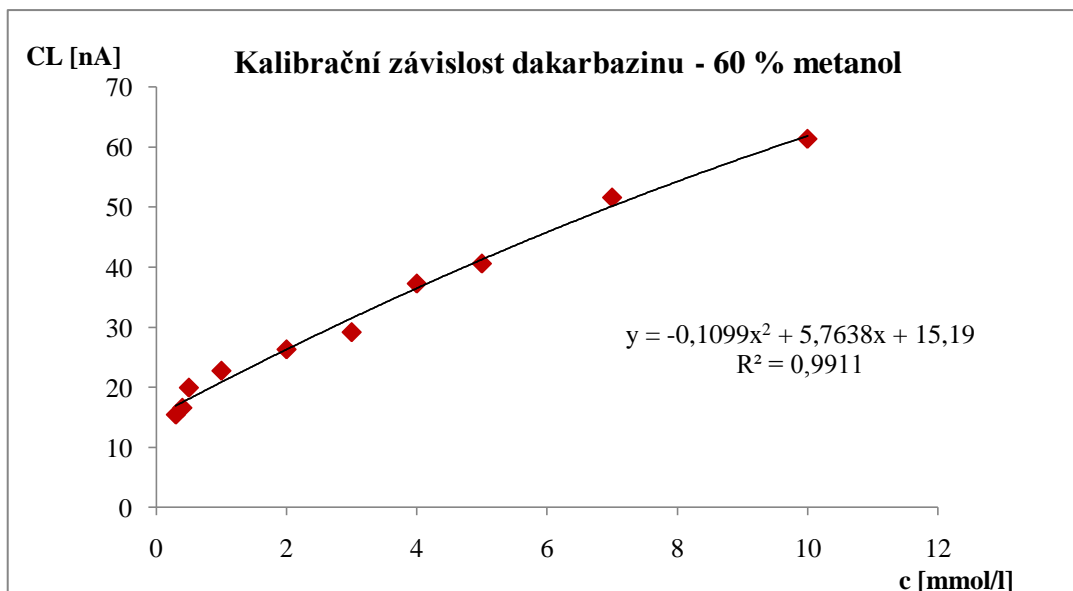
4.2.2 Kalibrační závislost dakarbazinu v 60% metanolu

Byla proměřena kalibrační závislost dakarbazinu připraveného v 60% metanolu bez zesilovačů podle optimalizovaného měřicího cyklu.

Tabulka 20: Kalibrační závislost dakarbazinu - 60% metanol

Koncentrace [mmol/l]	Ø výška píku	Hodnota CL [nA]
10,0	0,3068 ^a	61,368
7,0	0,2580 ^a	51,591
5,0	0,5073 ^b	40,584
4,0	0,4656 ^b	37,248
3,0	0,3643 ^b	29,144
2,0	0,6570 ^c	26,278
1,0	0,5680 ^c	22,719
0,5	0,4976 ^c	19,902
0,4	0,4136 ^c	16,543
0,3	0,3851 ^c	15,404
0,0	0,2200 ^c	8,800

Citlivost detektoru: ^a – 0,5 μ A, ^b – 0,2 μ A, ^c – 0,1 μ A.



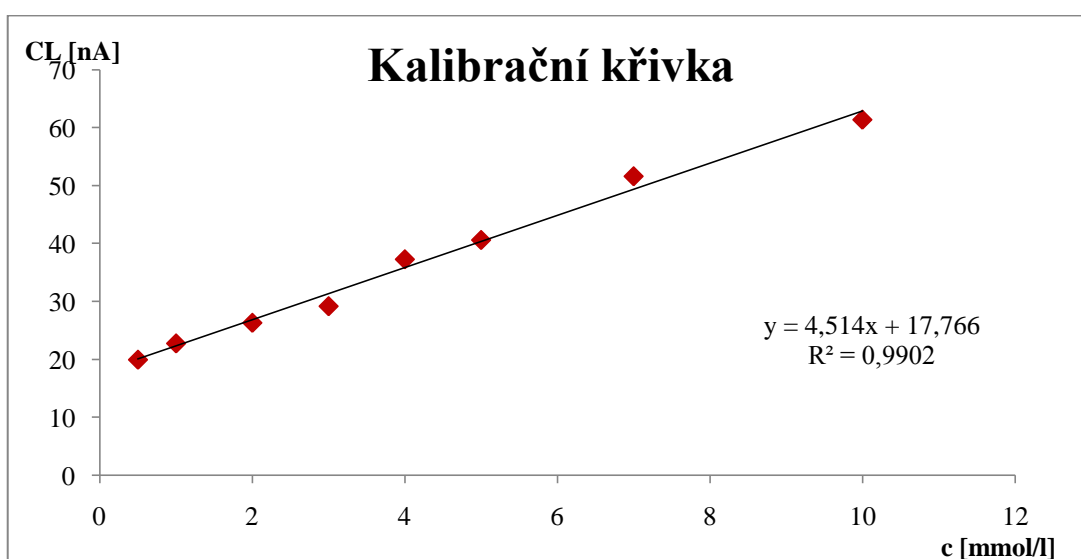
Obrázek 13: Kalibrační závislost dakarbazu - 60% metanol

Kalibrační závislost roztoku dakarbazu v 60% metanolu je polynomického tvaru.

Její rovnice a korelační koeficient byly vypočítány:

$$y = -0,1099x^2 + 5,7638x + 15,19$$

$$R^2 = 0,9911$$



Obrázek 14: Kalibrační křivka – 60% metanol, lineární část

Ideální tvar kalibrační křivky je přímka, proto byla z původní křivky vybrána jen určitá oblast 0,5 - 10 mmol/l, jejíž rovnice přímky a korelační koeficient byly vypočítány:

$$y = 4,514x + 17,766$$

$$R^2 = 0,9902$$

Hodnota detekčního limitu se rovná 13,6 nA ~ 0,2269 mmol/l, velikost kvantifikačního limitu je 24,8 nA ~ 0,7505 mmol/l.

4.2.3 Kalibrační závislost dakarbazinu v prostředí kyseliny mravenčí

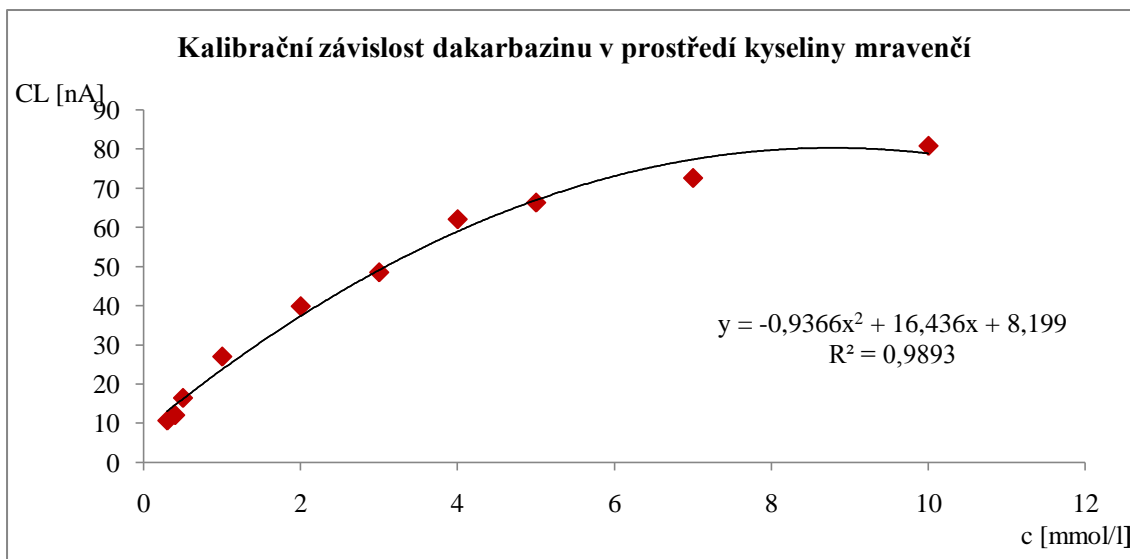
Byla proměřena kalibrační závislost dakarbazinu s 1,39 M kyselinou mravenčí jako zesilovačem podle optimalizovaného měřicího cyklu.

Tabulka 21: Kalibrační závislost dakarbazinu - 1,39 M kyselina mravenčí

Koncentrace [mmol/l]	Ø výška píku	Hodnota CL [nA]
10	0,4461 ^a	80,818
7	0,4050 ^a	72,603
5	0,9340 ^b	66,323
4	0,8808 ^b	62,064
3	0,7113 ^b	48,5
2	0,6029 ^b	39,832
1	0,4422 ^b	26,974
0,5	0,3100 ^b	16,401
0,4	0,5101 ^c	12,005
0,3	0,4754 ^c	10,615
0	0,2100 ^c	8,4

Citlivost

detektoru: ^a – 0,5 μA, ^b – 0,2 μA, ^c – 0,1 μA.



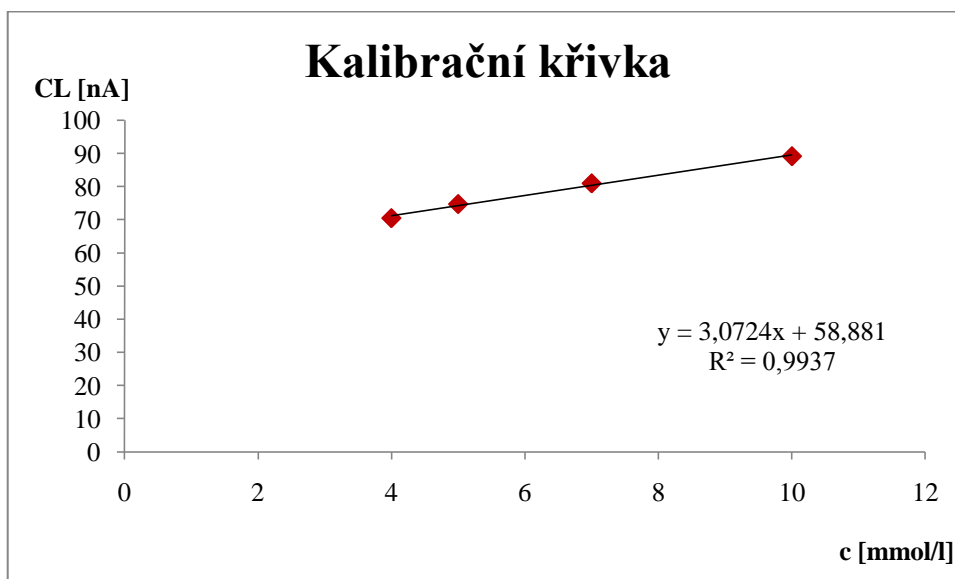
Obrázek 15: Kalibrační závislost dakarbazuinu v prostředí kyseliny mravenčí

Kalibrační závislost roztoku dakarbazuinu v prostředí kyseliny mravenčí je polynomického tvaru.

Její rovnice a korelační koeficient byly vypočítány:

$$y = -0,9366x^2 + 16,436x + 8,199$$

$$R^2 = 0,9893$$



Obrázek 16: Kalibrační křivka – kyselina mravenčí

Z původní křivky byla vybrána jen určitá oblast 4 - 10 mmol/l, protože tvarem kalibrační křivky, užívané pro praktické aplikace, má být přímka. Rovnice přímky a korelační koeficient byly vypočítány:

$$y = 3,0724x + 58,881$$

$$R^2 = 0,9937$$

Hodnota detekčního limitu se rovná 12 nA ~ 0,1077mmol/l, velikost kvantifikačního limitu je 20,4 nA ~ 0,3702 mmol/l.

4.2.4 Srovnání rozsahů jednotlivých kalibrací a jejich lineárních oblastí

Lineární oblast roztoku dakarbazinu za standardních podmínek nebyla nalezena s dostatečně vysokým korelačním koeficientem.

Pro roztok dakarbazinu v 60% metanolu byla ideální lineární oblast od 0,5 mM do 10 mM. Hodnota korelačního koeficientu byla 0,9902.

Roztok dakarbazinu v prostředí 1,39 M kyseliny mravenčí měl nejlepší lineární oblast v rozmezí hodnot od 4 mM do 10 mM, s hodnotou korelačního koeficientu 0,9937.

Nejvyšší hodnotu korelačního koeficientu kalibrační přímky měl postup stanovení dakarbazinu v prostředí 1,39 M kyseliny mravenčí, avšak větší lineární rozsah mělo měření s 60% metanolem.

4.3 Opakovatelnost

4.3.1 Opakovatelnost za standardních podmínek

Byla zkoušena opakovatelnost stanovení dakarbazinu bez zesilovačů podle optimalizovaného měřicího cyklu.

Tabulka 22: Opakovatelnost za standardních podmínek

č. měření/c [mmol/l]	5	1
1	0,33517	0,41666
2	0,34086	0,41588
3	0,32579	0,41740
4	0,34299	0,42857
5	0,33488	0,43412
6	0,32506	0,43753
7	0,33571	0,43216
8	0,3258	0,44662
9		0,46807
průměr	0,33328	0,43300
směr.odchylka	0,00700	0,01681
RSD [%]	2,10	3,88

Pro 5 mM roztok dakarbazinu je relativní směrodatná odchylka rovna 2,10%.

Pro 1 mM roztok dakarbazinu je relativní směrodatná odchylka rovna 3,88%.

4.3.2 Opakovatelnost v 60% metanolu

Byla zkoušena opakovatelnost stanovení dakarbazinu v 60% metanolu podle optimalizovaného měřicího cyklu.

Tabulka 23: Opakovatelnost v 60% metanolu

č. měření/c [mmol/l]	5	1
1	0,64756	0,35394
2	0,60286	0,36964
3	0,65975	0,36932
4	0,63496	0,3718
5	0,6475	0,37725
6	0,67402	0,36834
7	0,58957	0,35306
8	0,61900	0,36723
9	0,63795	0,35047
10	0,63325	0,35422
průměr	0,63464	0,36353
směr.odchylka	0,02541	0,00956
RSD [%]	4,00	2,63

Pro 5 mM roztok dakarbazinu je relativní směrodatná odchylka rovna 4,00%.

Pro 1 mM roztok dakarbazinu je relativní směrodatná odchylka rovna 2,63%.

4.3.3 Opakovatelnost s 1,39 M kyselinou mravenčí

Byla zkoušena opakovatelnost stanovení dakarbazinu s 1,39 M kyselinou mravenčí podle optimalizovaného měřicího cyklu.

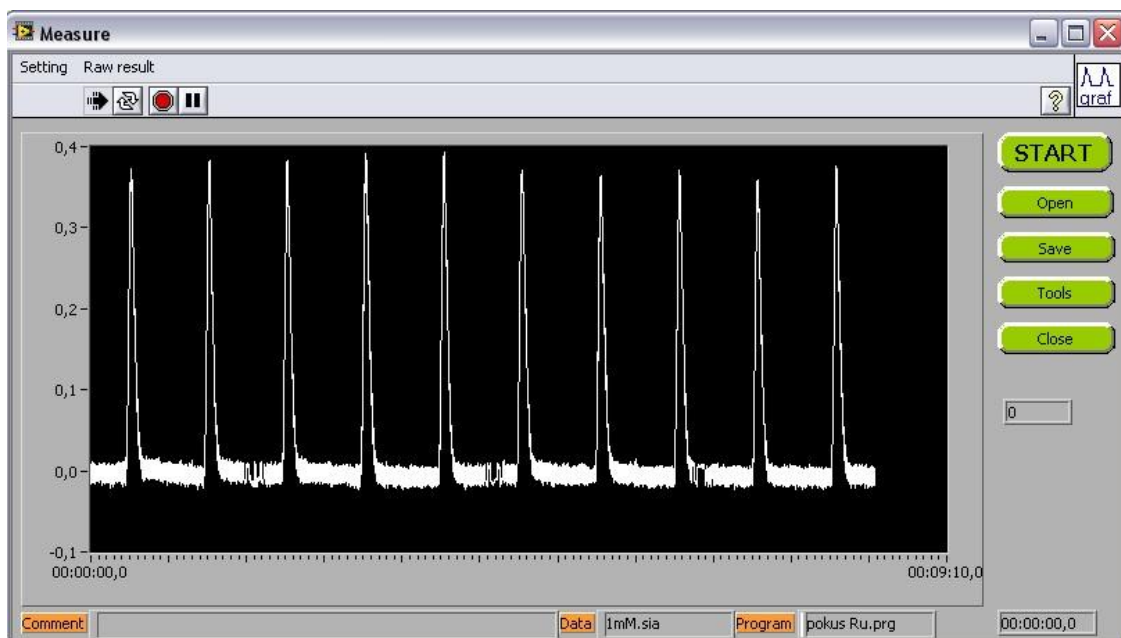
Tabulka 24: Opakovatelnost s 1,39 M kyselinou mravenčí

č. měření/c [mmol/l]	5	1
1	0,69145	0,73531
2	0,72673	0,71672
3	0,71899	0,75182
4	0,72974	0,73387
5	0,73254	0,76372
6	0,72582	0,74043
7	0,72185	0,76688
8	0,73694	0,72424
9	0,73246	0,75526
10	0,75551	0,79426
průměr	0,72720	0,74825
směr.odchylka	0,01611	0,02303
RSD [%]	2,22	3,08

Pro 5 mM roztok dakarbazinu je relativní směrodatná odchylka rovna 2,22%.

Pro 1 mM roztok dakarbazinu je relativní směrodatná odchylka rovna 3,08%.

Nejlepší opakovatelnosti pro měření 1 mM roztoku dakarbazinu bylo dosaženo v přítomnosti 60% metanolu. Nejlepší opakovatelnosti pro 5 mM roztok dakarbazinu bylo dosaženo bez přítomnosti zesilovačů, přičemž opakovatelnost téhož roztoku s 1,39 M kyselinou mravenčí byla podobná.



Obrázek 17: Záznam měření opakovatelnosti 1mM roztoku dakarbazinu v 60% metanolu

4.4 Souhrn

Z měření vyplynuly následující výsledky:

Optimalizace systému:

- Při optimalizaci objemů a koncentrací činidel bylo nejlepší použití 3 μl 10 mM roztoku manganistanu draselného a 80 μl (rozdělených do 2 x 40 μl) 1 M kyseliny sírové.
- Před testováním průtokových rychlostí byl zjištěn nárůst chemiluminiscenčního signálu při promíchání aspirovaných zón změnou směru toku nosného proudu (byl testován pouze jeden krok mísení, protože použitá reakce probíhá velmi rychle). Nejlepší hodnota průtokové rychlosti byla 40 $\mu\text{l/s}$.
- Výsledná struktura měřicího cyklu je:
 - aspirace 40 μl 1 M kyseliny sírové
 - aspirace 3 μl 10 mM manganistanu draselného
 - aspirace 30 μl 10 mM roztoku dakarbazinu
 - aspirace 40 μl 1 M kyseliny sírové
 - případná aspirace 50 μl zesilovače
 - aspirace roztoků probíhala za průtokové rychlosti 100 $\mu\text{l/s}$
 - promísení
 - transport do detektoru
 - průtoková rychlost pro transport do detektoru 40 $\mu\text{l/s}$
 - aspirace 0,5 M kyseliny šťavelové
 - promytí systému kyselinou šťavelovou
- Jako nejlepší rozpouštědla byla vybrána voda a 60% metanol, který ve srovnání s destilovanou vodou zvýšil signál šestkrát. 60% etanol sice také zvýšil signál, ale měl ve srovnání s metanolem vysokou hodnotu signálu slepého roztoku.

- Vliv polyfosfátu sodného, kyseliny mravenčí, glutaraldehydu a formaldehydu jako zesilovačů signálu měl za výsledek nejlepší uplatnění kyseliny mravenčí. Nejvýraznější zvýšení chemiluminiscenčního signálu bylo získáno s 1,39 M kyselinou mravenčí a to 7,6 krát oproti vodnému roztoku dakarbazinu.

Kalibrační křivky:

- Lineární oblast roztoku dakarbazinu za standardních podmínek nebyla nalezena s dostatečně vysokým korelačním koeficientem. Hodnota detekčního limitu se rovná 1,12 nA ~ 0,1474 mmol/l, velikost kvantifikačního limitu je 2,8 nA ~ 0,4999 mmol/l.
- Pro roztok dakarbazinu v 60 % metanolu byla ideální lineární oblast 0,5 – 10 mmol/l. Hodnota korelačního koeficientu byla 0,9902. Hodnota detekčního limitu se rovná 13,6 nA ~ 0,2269 mmol/l, velikost kvantifikačního limitu je 24,8 nA ~ 0,7505 mmol/l.
- Roztok dakarbazinu v prostředí 1,39 M kyseliny mravenčí měl nejlepší lineární oblast v rozmezí hodnot 4 – 10 mmol/l s hodnotou korelačního koeficientu 0,9937. Hodnota detekčního limitu se rovná 12 nA ~ 0,1077 mmol/l, velikost kvantifikačního limitu je 20,4 nA ~ 0,3702 mmol/l.

Největší rozsah kalibrační přímky mělo stanovení dakarbazinu s 60% metanolem, ale vyšší hodnotu korelačního koeficientu kalibrační přímky mělo stanovení s 1,39 M kyselinou mravenčí. Nejnižší hodnotu detekčního a kvantifikačního limitu mělo stanovení s 1,39 M kyselinou mravenčí.

Opakovatelnost:

- Pro 5 mM roztok dakarbazinu za standardních podmínek je relativní směrodatná odchylka rovna 2,10%.
- Pro 1 mM roztok dakarbazinu za standardních podmínek je relativní směrodatná odchylka rovna 3,88%.
- Pro 5 mM roztok dakarbazinu v 60% metanolu je relativní směrodatná odchylka rovna 4,00%.

- Pro 1 mM roztok dakarbazinu v 60% metanolu je relativní směrodatná odchylka rovna 2,63%.
- Pro 5 mM roztok dakarbazinu s kyselinou mravenčí je relativní směrodatná odchylka rovna 2,22%.
- Pro 1 mM roztok dakarbazinu s kyselinou mravenčí je relativní směrodatná odchylka rovna 3,08%.

Nejlepší opakovatelnosti pro 1 mM roztok dakarbazinu bylo dosaženo v přítomnosti 60% metanolu. Nejlepší opakovatelnosti pro 5 mM roztok dakarbazinu bylo dosaženo bez přítomnosti zesilovačů, přičemž opakovatelnost téhož roztoku s 1,39 M kyselinou mravenčí byla podobná.

5 Závěr

Cílem práce byla optimalizace stanovení dakarbazinu sekvenční injekční analýzou s chemiluminiscenční detekcí.

Výsledkem byla tři schémata stanovení, a to: dakarbazin ve vodném prostředí bez zesilovačů, dakarbazin v prostředí 60% metanolu a dakarbazin s 1,39 M kyselinou mravenčí jako zesilovačem.

Podle opakovatelnosti bylo nejlepším schématem dakarbazin s 60% metanolem pro 1 mM roztok dakarbazinu, standardní podmínky pro 5 mM roztok dakarbazinu.

Podle hodnoty korelačního koeficientu lineární oblasti a CL hodnot mělo nejlepší výsledky schéma s 1,39 M kyselinou mravenčí.

Avšak nepodařilo se SIA stanovení zoptimalizovat tak, aby výsledky byly srovnatelné s HPLC metodou. Detekční limit u stanovení dakarbazinu HPLC metodou byl podle článku [4] 12,5 ng/ml. Stanovením dakarbazinu SIA metodou vyšel detekční limit u schématu dakarbazin ve vodném prostředí bez zesilovačů 26,85 µg/ml, u stanovení dakarbazinu s 1,39 M HCOOH 19,62 µg/ml a u stanovení dakarbazinu s 60% metanolem 41,34 µg/ml; což je méně citlivější než HPLC stanovení dakarbazinu.

6 Seznam obrázků a tabulek

Obrázek 1: Dakarbazin	9
Obrázek 2: Pořadí kroků SIA měření [8]	14
Obrázek 3: Uspořádání klasického SIA systému [8]	15
Obrázek 4: Batch-flow metoda [8]	17
Obrázek 5: Průtokový systém SIA [8].....	18
Obrázek 6: Chemiluminiscenční modul	28
Obrázek 7: Vliv dávkovaného objemu manganistanu draselného na intenzitu chemiluminiscenčního signálu	38
Obrázek 8: Vliv dávkovaného objemu kyseliny sírové na intenzitu chemiluminiscenčního signálu	40
Obrázek 9: Vliv průtokové rychlosti na intenzitu chemiluminiscenčního signálu	42
Obrázek 10: Porovnání vlivu zesilovačů chemiluminiscenčního signálu	45
Obrázek 11: Vliv koncentrace kyseliny mravenčí na chemiluminiscenční signál	46
Obrázek 12: Kalibrační závislost dakarbazinu – standardní podmínky	48
Obrázek 13: Kalibrační závislost dakarbazinu - 60% metanol	50
Obrázek 14: Kalibrační křivka – 60% metanol, lineární část	50
Obrázek 15: Kalibrační závislost dakarbazinu v prostředí kyseliny mravenčí	52
Obrázek 16: Kalibrační křivka – kyselina mravenčí.....	52
Obrázek 17: Záznam měření opakovatelnosti 1mM roztoku dakarbazinu v 60% metanolu	57
Tabulka 1: Ředění zásobního roztoku manganistanu draselného	30
Tabulka 2: Ředění zásobního roztoku kyseliny sírové	30
Tabulka 3: Ředění zásobního roztoku dakarbazinu	31
Tabulka 4: Ředění zásobního roztoku glutaraldehydu.....	31
Tabulka 5: Ředění zásobního roztoku kyseliny mravenčí	32
Tabulka 6: Rozsah koncentrací a dávkovaných objemů činidel	33
Tabulka 7: Rozmezí koncentrací zesilovačů	34
Tabulka 8: Objem 10 mM manganistanu draselného	37
Tabulka 9: Objem 1 mM manganistanu draselného	38
Tabulka 10: Objem 0,5 M kyseliny sírové o koncentraci	39
Tabulka 11: Objem 1 M kyseliny sírové o koncentraci	39
Tabulka 12: Objem 1,5 M kyseliny sírové o koncentraci	40
Tabulka 13: Objem 2 M kyseliny sírové o koncentraci	40
Tabulka 14: Rozdělené objemy kyseliny sírové 1 M a 1,5 M	41
Tabulka 15: Velikost odezvy v závislosti na rychlosti průtoku	42
Tabulka 16: Použitá rozpouštědla	44
Tabulka 17: Použité zesilovače	45
Tabulka 18: Kyselina mravenčí jako zesilovač	46

Tabulka 19: Kalibrační závislost dakarbazinu - standardní podmínky	47
Tabulka 20: Kalibrační závislost dakarbazinu - 60% metanol.....	49
Tabulka 21: Kalibrační závislost dakarbazinu - 1,39 M kyselina mravenčí	51
Tabulka 22: Opakovatelnost za standardních podmínek	54
Tabulka 23: Opakovatelnost v 60% metanolu	55
Tabulka 24: Opakovatelnost s 1,39 M kyselinou mravenčí.....	56

7 Seznam zkratek

DTIC	dakarbazin
SIA	sekvenční injekční analýza
FIA	průtoková injekční analýza
TLC	tenkovrstvá chromatografie
CRL	chemicky referenční látka
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelné záření
CL	chemiluminiscence
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CE	kapilární elektroforéza
BI	bead injection techniky
SIC	sekvenční injekční chromatografie
LOV	lab-on-valve uspořádání
RSD	relativní směrodatná odchylka
MPV	vícecestný selekční ventil
RC	reakční cívka
PMT	fotonásobičový detektor

8 Seznam použité literatury

1. Klener P., Protinádorová chemoterapie, Galén 1996.
2. Hartl J., Doležal M., Miletín M., Opletalová V., Zimčík P., Farmaceutická chemie IV, Nakladatelství Karolinum Praha, 2006.
3. Český lékopis 2009, 2. díl, Grada Publishing a.s., 2009.
4. King D.T., Stewart J.T., J. Liq. Chrom. 16(11) (1993) 2309-2323. (Abstrakt, Web of science 1/2010)
5. Haque A., Stewart J.T., J. Liq. Chrom. 22(6) (1999) 933-943.(Abstrakt, Web of science 1/2010)
6. Paseková H., Polášek M., Solich P., Chem. Listy 93 (1999) 354 – 359.
7. Ruzicka J., Marshall G.D., Anal. Chim. Acta, 237 (1990) 329-343.
8. Růžička, J.: Flow injection, 4th Edition, FIALab Instruments Inc., 2009.
9. Ruzicka J., Analyst, 125 (2000) 1053-1060.
10. Mervartová K., Polášek M., Calatayud J.M., J. Pharm. Biomed. Anal. 45 (2007) 367-381.
11. Jacqui L. Adcock, Paul S. Francis, Neil W. Barnett, Anal. Chim. Acta 601 (2007) 36-67.
12. FIALab <http://www.flowinjection.com/method2.aspx> (4/2009).
13. Liu Y.,Zhang W., Yang Y., Talanta 77 (2008) 412-421.