

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI**  
**KRÁLOVÉ**

**Katedra analytické chemie**



**Studie chemiluminiscenčních vlastností metforminu pomocí  
sekvenční injekční analýzy**

**Hradec Králové 2011**

**Mgr. 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. Tato práce nebyla využita k získání stejného nebo jiného titulu.“

### **Poděkování**

Chtěla bych tímto poděkovat vedoucí rigorózní práce PharmDr. Haně Sklenářové Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, vstřícnost a trpělivost během vypracovávání této práce.

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Mgr. Markéta Horáková

Konzultant: PharmDr. Hana Sklenářová Ph.D.

Název rigorózní práce: Studie chemiluminiscenčních vlastností metforminu pomocí sekvenční injekční analýzy

Chemiluminiscenční vlastnosti metforminu byly studovány pomocí sekvenční injekční analýzy ve třech systémech s různým složením činidel. První systém používal manganistan draselný a kyselinu sírovou, druhý síran ceričitý a (tris(2,2'-bipyridyl)dichloro-ruthenium hexahydrát. Třetí systém využíval N-bromsukcinimid a fluorescein. U prvních dvou systémů byla optimalizována průtoková rychlost, koncentrace a objemy činidel, schéma měřicího cyklu a použítá rozpouštědla. U třetího systému koncentrace N-bromsukcinimidu (NBS) a fluoresceinu vycházela z údajů vyhledaných v odborné literatuře [Zhouping Wang, Anal. Lett. 2003]. Objem a rychlost byly nalezeny automaticky s využitím programu FaFSIAOptim, vytvořeným na Katedře analytické chemie. Schéma měřicího cyklu bylo optimalizováno stejným způsobem jako u předešlých dvou systémů. Během optimalizace a následného měření bylo zjištěno, že jediným vhodným systémem je třetí systém s NBS a fluoresceinem. Proto bylo dále pokračováno jen s ním. Postup odpovídal výslednému schématu shrnujícímu optimální podmínky měření: 66  $\mu\text{l}$  0,01 M roztoku NBS, 36  $\mu\text{l}$  0,05 mM roztoku fluoresceinu, 58  $\mu\text{l}$  2,5 mM roztoku cetyltrimethylamonium bromidu, 100  $\mu\text{l}$  roztoku metforminu, rychlost transportu zóny produktu do detektoru 88  $\mu\text{l/s}$ , napětí fotonásobiče 400 V. Kalibrační závislost (v rozmezí  $10^{-7}$  –  $10^{-2}$  M) u tohoto systému měla polynomický tvar. Lineární závislost chemiluminiscenčního signálu na koncentraci metforminu byla nalezena v oblasti  $1 \times 10^{-3}$  –  $5 \times 10^{-5}$  M koncentrace metforminu. Hodnota detekčního limitu byla  $5 \times 10^{-8}$  M (8,28 ng/ml), kvantifikační limit měl hodnotu  $2 \times 10^{-7}$  M (33,12 ng/ml). Opakovatelnost byla proměřena u roztoků metforminu o koncentraci  $10^{-4}$  M a

$10^{-3}$  M. U roztoku metforminu o koncentraci  $10^{-3}$  M byla získána RSD hodnota 1,59 %;  
u roztoku o koncentraci  $10^{-4}$  M 2,11 %.

# ABSTRACT

**Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of analytical chemistry**

Candidate: Mgr. Markéta Horáková

Consultant: PharmDr. Hana Sklenářová Ph.D.

Title of Thesis: Study of chemiluminescence properties of metformin using sequential injection analysis

Chemiluminescent properties of metformin were studied using a sequential injection analysis in the three systems with different composition of the reagents. The first system used potassium permanganate and sulfuric acid, the second cerium sulfate tetrahydrate and (tris (2,2'-bipyridyl) dichloro-ruthenium hexahydrate. The third system used the N-bromosuccinimide and fluorescein. The flow rate, concentration and volumes of reagents, scheme of the measuring cycle and used solvents have been optimized into the first two systems. The concentration of N-bromosuccinimide (NBS) and fluorescein in the third system were based on data found in literature [Zhouping Wang, Anal. Lett. 2003]. The volume and speed were detected automatically using the program FaFSIAOptim, created the Department of Analytical Chemistry. Scheme of the measuring cycle was optimized in the same way as in the previous two systems. During the optimization, and subsequent measurements revealed that the only suitable system is the third system with NBS and fluorescein. Therefore, further extending only to him. Process matched the resulting diagram summarizing the optimal measuring conditions: 66  $\mu\text{l}$  0.01 M solution of NBS, 36  $\mu\text{l}$  0.05 mM solution of fluorescein, 58  $\mu\text{l}$  2.5 mM solution of cetyltrimethylammonium bromide, 100  $\mu\text{l}$  solution of metformin, the speed of the transport the zone of the product to the detector 88  $\mu\text{l/s}$ , photomultiplier voltage 400 V. Standard curve (range  $10^{-7}$  -  $10^{-2}$  M) on this system have polynomial shape. Linear dependence of the chemiluminescent signal on the concentration of metformin was found in the  $1 \times 10^{-3}$  -  $5 \times 10^{-5}$  M concentrations of metformin. The value of detection limit was  $5 \times 10^{-8}$  M (8.28 ng / ml), limit of quantification has the value  $2 \times 10^{-7}$  M (33.12 ng / ml). Repeatability was measured in solutions of metformin concentration  $10^{-4}$  M and

$10^{-3}$  M. With the metformin solution of concentration  $10^{-3}$  M was obtained RSD value of 1.59%, with concentration of  $10^{-4}$  M it was 2.11%.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Seznam obrázků .....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>Seznam tabulek .....</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>Seznam zkratek .....</b>	<b>12</b>
<b>4</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>13</b>
<b>5</b>	<b>Cíl a popis zadání práce .....</b>	<b>14</b>
<b>6</b>	<b>Teoretická část .....</b>	<b>15</b>
6.1	Metformin .....	15
6.1.1	Jiná stanovení metforminu.....	17
6.2	Sekvenční injekční analýza .....	19
6.2.1	MicroSIA v Lab-on-valve uspořádání .....	20
6.2.2	„Bead injection“ techniky (BI) .....	22
6.2.3	Sekvenční injekční chromatografie (SIC).....	23
6.3	Chemiluminiscence .....	25
<b>7</b>	<b>Experimentální část .....</b>	<b>29</b>
7.1	Použitá zařízení .....	30
7.2	Použité chemikálie .....	32
7.3	Základní a pracovní roztoky .....	32
7.3.1	Systém metformin s manganistanem draselným a kyselinou sírovou .....	33
7.3.2	Chemiluminiscence metforminu v systému se síranem ceričitým a (tris(2,2'-bipyridyl)dichloro-ruthenium hexahydrátem).....	34
7.3.3	Chemiluminiscence metforminu v systému s N-bromsukcinimidem a fluoresceinem .....	35
7.4	Optimalizace metody.....	37
7.4.1	Chemiluminiscence metforminu v systému s manganistanem draselným a kyselinou sírovou .....	37
7.4.1.1	Optimalizace jednotlivých parametrů .....	38
7.4.2	Chemiluminiscence metforminu v systému se síranem ceričitým a (tris(2,2'-bipyridyl)dichloro-ruthenium .....	39
7.4.2.1	Optimalizace jednotlivých parametrů .....	39



7.4.3	Chemiluminiscence metforminu v systéme s N-bromsukcinimidem a fluoresceinem .....	40
7.4.3.1	Optimalizace jednotlivých parametrů .....	40
7.5	Kalibrační závislosti .....	41
7.6	Opakovatelnost.....	41
<b>8</b>	<b>Výsledky a diskuse .....</b>	<b>42</b>
8.1	Optimalizace metody.....	43
8.1.1	Výsledky optimalizace u systému metforminu s manganistanem draselným a kyselinou sírovou .....	43
8.1.1.1	Průtoková rychlost .....	43
8.1.1.2	Objemy a koncentrace činidel .....	43
8.1.1.3	Schéma měřicího cyklu .....	47
8.1.2	Výsledky optimalizace u systému metforminu se síranem ceričitým a (tris(2,2'-bipyridyl)dichloro-rutheniem .....	48
8.1.2.1	Použitá rozpouštědla .....	48
8.1.2.2	Koncentrace činidel.....	49
8.1.2.3	Průtoková rychlost a struktura cyklu.....	53
8.1.2.4	Objemy činidel .....	57
8.1.3	Výsledky optimalizace u systému metforminu s N-bromsukcinimidem a fluoresceinem .....	62
8.1.3.1	Schéma cyklu .....	62
8.2	Kalibrační závislosti u systému metforminu s N-bromsukcinimidem a fluoresceinem.....	69
8.3	Opakovatelnost u systému metforminu s N-bromsukcinimidem a fluoresceinem ..	72
8.4	Souhrn .....	74
<b>9</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>76</b>
<b>10</b>	<b>Použitá literatura .....</b>	<b>77</b>

# 1 Seznam obrázků

Obrázek 1: Chemická struktura metformin hydrochloridu .....	15
Obrázek 2: Uspořádání SIA systému [8]. .....	19
Obrázek 3: Uspořádání MicroSIA LOV [8]. .....	21
Obrázek 4: LOV modul [8]. .....	21
Obrázek 5: Pořadí kroků BI [8]. .....	23
Obrázek 6: Uspořádání SIC systému [8]. .....	24
Obrázek 7: Chemiluminiscenční systém s luminolem [10]. .....	25
Obrázek 8: Srovnání signálů u různých objemů a koncentrací roztoku metforminu. ....	45
Obrázek 9: Srovnání vlivu koncentrací a objemů roztoku Ce v různých prostředích na CL signál. ....	52
Obrázek 10: Závislost velikosti CL na objemu 10 mM roztoku ceričitých iontů. ....	58
Obrázek 11: Závislost velikosti CL na objemu 1 mM roztoku ruthenia. ....	59
Obrázek 12: Závislost velikosti CL na objemu 0,4 M roztoku octanu sodného. ....	60
Obrázek 13: Pracovní kalibrace. ....	65
Obrázek 14: Kalibrační závislost systému metforminu s fluoresceinem a NBS. ....	70
Obrázek 15: Lineární úsek kalibrační křivky metforminu s fluoresceinem a NBS. ....	70
Obrázek 16: Opakovatelnost $10^{-3}$ M roztok metforminu. ....	73

## 2 Seznam tabulek

Tabulka 1: Rozsah koncentrací a dávkovaných objemů činidel. ....	38
Tabulka 2: Rozsah dávkovaných objemů činidel. ....	40
Tabulka 3: Vliv objemu a koncentrace roztoků metforminu. ....	44
Tabulka 4: Proměření intenzity chemiluminiscence po propláchnutí kys. šťavelovou. .	46
Tabulka 5: Závislost intenzity chemiluminiscenčního signálu 0,1 mM metforminu na použitém rozpouštědle. ....	48
Tabulka 6: Orientační proměření kalibrační závislosti roztoku metforminu v 50 % ethanolu. ....	49
Tabulka 7: Vliv objemu 10 mM roztoku ceričitých iontů na velikost signálu. ....	50
Tabulka 8: Vliv objemu 5 mM roztoku ceričitých iontů na velikost signálu. ....	50
Tabulka 9: Vliv objemu 10 mM roztoku ceričitých iontů na velikost signálu. ....	51
Tabulka 10: Vliv objemu 5 mM roztoku ceričitých iontů na velikost signálu. ....	51
Tabulka 11: Vliv průtokové rychlosti. ....	54
Tabulka 12: Průtoková rychlost po promísení. ....	55
Tabulka 13: Vliv objemu 10 mM roztoku ceričitých iontů. ....	57
Tabulka 14: Vliv objemu 1 mM roztoku ruthenia. ....	58
Tabulka 15: Vliv objemu 0,4 M roztoku octanu sodného. ....	59
Tabulka 16: Změna průtokové rychlosti u schématu 1. ....	62
Tabulka 17: Změna průtokové rychlosti u schématu 2. ....	63
Tabulka 18: Pracovní kalibrace. ....	65
Tabulka 19: Hodnoty získané automatickou optimalizací. ....	66
Tabulka 20: Kalibrační závislost roztoku metforminu. ....	69
Tabulka 21: Opakovatelnost. ....	72

### 3 Seznam zkratek

BI	„bead injection“ techniky
CE	kapilární elektroforéza
CL	chemiluminiscence
CRL	chemicky referenční látka
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
FIA	průtoková injekční analýza
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
LOV	„lab-on-valve“ modul
MPV	vícecestný selekční ventil
NBS	N-bromsukcinimid
RC	reakční cívka
RSD	relativní směrodatná odchylka
SIA	sekvenční injekční analýza
SIC	sekvenční injekční chromatografie
TLC	tenkovrstvá chromatografie
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelné záření

## 4 Úvod

Sekvenční injekční analýza patří mezi moderní průtokové metody s mnohostraným využitím. Její výhodou je použití malého množství vzorku, rychlost analýzy, automatizace a snadné ovládání. Chemiluminiscence je detekční technika, která se vyznačuje širokými koncentračními rozsahy, nízkými limity detekce a kvantifikace a přístrojovou nenáročností. Kombinací obou se získá metoda se značnou selektivitou analýzy.

## 5 Cíl a popis zadání práce

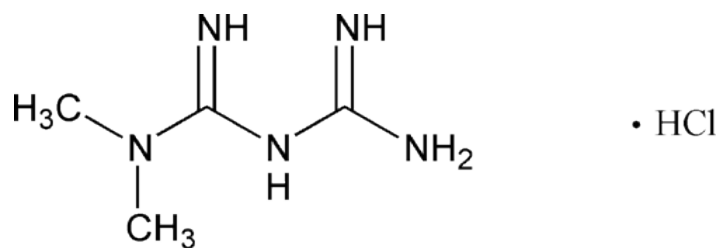
Cílem práce bylo popsat chemiluminiscenční vlastnosti metforminu pomocí sekvenční injekční analýzy za použití tří systémů s různým složením činidel. Jeden systém používal manganistan draselný a kyselinu sírovou, ve druhém byl použit síran ceričitý a (tris(2,2'-bipyridyl)dichloro-ruthenium hexahydrát. Třetí systém využíval N-bromsukcinimid a fluorescein. U všech tří chemiluminiscenčních systémů byla prováděna optimalizace, u třetího systému také studium kalibračního a lineárního rozsahu a měření opakovatelnosti.

## 6 Teoretická část

### 6.1 Metformin

Metformini hydrochloridum [2]  $C_6H_{12}ClN_5$  Mr 165,63

Je to 1,1-dimethylbiguanid-hydrochlorid.



Obrázek 1: Chemická struktura metformin hydrochloridu.

Metformin je perorální antidiabetikum ze skupiny biguanidů. Po perorálním podání se vstřebává 50-60% dávky, v organismu se nebiotransformuje a vylučuje se v nezměněné formě prakticky úplně močí [3].

#### Vlastnosti [2]

Jsou to bílé nebo téměř bílé krystaly, snadno rozpustné ve vodě, těžce rozpustné v ethanolu 96% a prakticky nerozpustné v acetonu a v dichlormethanu.

#### Zkoušky totožnosti [2]

Ke zkouškám totožnosti patří:

- Teplota tání (2.2.14). 222 °C až 226 °C.
- Infračervená absorpční spektrofotometrie - pomocí tablet s chloridem draselným R, v porovnání s metformin–hydrochloridem CRL.

- C. Tenkovrstvá chromatografie se stacionární fází ze silikagelu G pro TLC R. Kde mobilní fáze je tvořena ledovou kyselinou octovou R, butan-1-olem R a vodou (10 + 40 + 50). Nanáší se 5 µl po dráze 15 cm, suší se 15 min při 100 – 105 °C. K detekci se používá směs stejných objemových dílů nitroprussidu sodného R, roztoku hexakvanoželezitanu draselného R a roztoku hydroxidu draselného R připravená 20 min před použitím. Hlavní skvrna na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídá skvrně metformin-hydrochloridu CRL.
- D. Reakce zkoušeného roztoku (5 mg ve 100 ml) s koncentrovaným hydroxidem sodným RS a 1-naftolem. Směs se nechá 15 min stát ve vodě s ledem, pak se přidá bromnan sodný RS, po promíchání vzniká růžové zbarvení.

## **Zkoušky na čistotu [2]**

*Vzhled roztoku*, roztok je čirý (2.2.1) a bezbarvý (2.2.2, metoda II)

*Příbuzné látky* – kapalinová chromatografie - připraví se zkoušený a porovnávací roztok. Kolona je 0,25 m dlouhá s vnitřním průměrem 4,6 mm, stacionární fází je pravidelný porézní silikagel s chemicky vázanými skupinami kyseliny benzensulfonové. Mobilní fáze je tvořena roztokem dihydrogenfosforečnanu amonného R, jehož pH bylo upraveno kyselinou fosforečnou R na hodnotu 3,0. Průtoková rychlost je 1 ml/min, nastříkuje se 20 µl, detekce se provádí pomocí spektrofotometrického detektoru při 218 nm. Doba záznamu by měla být dvojnásobkem retenčního času metformin-hydrochloridu. Nečistota A (1-kyanquanidin) může mít nejvýše plochu píku odpovídající píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (a), což je 0,02 %. Ostatní nečistoty mají nejvýše plochu hlavního píku na chromatogramu porovnávacího roztoku (b) tedy 0,1%.

*Těžké kovy* (2.4.8), nejvýše 10 µg/g.

*Ztráta sušením* (2.2.32), nejvýše 0,5%, 1,000 g se suší 5 h v sušárně při 105 °C.

*Síranový popel* (2.2.14), nejvýše 0,1%, stanoví se s 1,000 g zkoušené látky.



## Stanovení obsahu [2]

0,1 g se rozpustí ve 4 ml kyseliny mravenčí bezvodé R, přidá se 80 ml acetonitrilu R a ihned se titruje kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS za potenciometrické indikace bodu ekvivalence.

1 ml kyseliny chloristé 0,1 mol/l VS odpovídá 16,56 mg  $C_4H_{12}ClN_5$ .

### 6.1.1 Jiná stanovení metforminu

V odborné literatuře byly nalezeny práce zabývající se stanovením metforminu, které budou stručně shrnuty v této kapitole. Metformin byl stanovován např. kapilární zónovou elektroforézou, kapalinovou chromatografií, potenciometrií, spektrofluorometrií a UV-VIS spektrofotometrií.

U kapilární zónové elektroforézy byl stanovován spolu s roziglitazonem. Optimální separace bylo dosaženo za méně jak 9 min při 25 °C v křemenné kapiláře (80,5 cm x 75  $\mu$ m, skutečná délka 72 cm) s použitím toku 25 mM acetátového pufru o pH 4,0. Vzorky byly injikovány po dobu 3 s pod tlakem 50 mbar při napětí +25,0 kV. Detekční a kvantifikační limit byl 0,5 a 1  $\mu$ g/ml [4].

Další stanovení metforminu bylo prováděno gradientovou kapalinovou chromatografií s UV detekcí. Stanovení bylo opět společné pro metformin a roziglitazon. Analýza byla prováděna na fenylové koloně (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), užitá gradientová metoda využívala mobilní fázi obsahující acetonitril : 5 mM octanový pufr pH 5,5 v počátečním poměru 75:25→65:35. Průtoková rychlost byla 1 ml.min<sup>-1</sup>. UV detekce probíhala při 245 nm a verapamil byl užit jako vnitřní standard. Celkový čas měření byl méně než 10 min. Limit kvantifikace byl 10 ng.ml<sup>-1</sup> pro roziglitazon a 250 ng.ml<sup>-1</sup> pro metformin [5].

Potenciometrická technika je založena na přípravě PVC membránových senzorů obsahujících metformin s amidosíranem amonným a metformin wolframovo-křemičité iontové páry jako elektroaktivní částice s dioktylfthalátem a o-nitrofenyloktyletherem jako změkčovači. Tyto senzory dávají rychlou Nernstovu odpověď pro 10<sup>-1</sup> – 10<sup>-5</sup> M metformin v rozmezí pH 5-11 [6]. Spektrofluorimetrická

metoda je založena na reakci metforminu s chrysenechinonem v alkalickém prostředí za vzniku Schiffových bází, které hydrolyzou poskytují volné báze. Později, v přítomnosti 1-naftolu vzniká fluorescenční produkt s excitačním a emisním maximem při 450 a 520 nm. Vztah mezi fluorescencí a koncentrací metforminu je lineární v rozsahu 20-200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  [6].

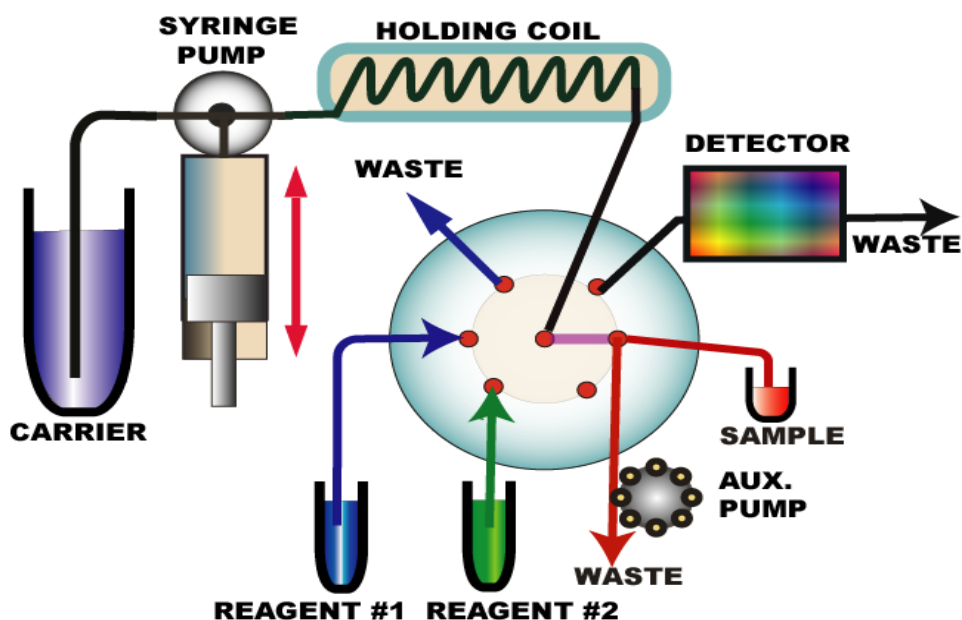
Navrhované spektrofotometrické techniky zahrnují reakce metforminu s měďnatými ionty v alkalickém prostředí za vzniku komplexu. Komplex Cu-metformin se extrahuje do cyklohexylaminu a jeho absorbance je měřena při 540 nm. Kalibrace je lineární v rozsahu 0,5-2  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  metforminu [6].

Další stanovení metforminu bylo provedeno průtokovou injekční chemiluminiscenční detekcí. Metoda je založena na CL produkované během oxidace NBS v alkalickém prostředí za přítomnosti fluoresceinu jako efektivního energetického přenašeče. CTAB je použit jako zesilovač, který zvýší signál až stokrát. Detekční limit u tohoto měření byl  $2,3 \times 10^{-9} \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  [1].

## 6.2 Sekvenční injekční analýza

Sekvenční injekční analýza patří do druhé generace průtokové analýzy a je založena na programovatelnosti toku.

Základní SIA systém se skládá z obousměrné pístové pumpy, mísící cívky, vícecestného selekčního ventilu, detektoru, hadiček a počítače s ovládacím programem. Ten synchronizuje pohyb pístové pumpy a vícecestného selekčního ventilu v předem definovaném objemu a směru toku různých roztoků. V typickém analytickém cyklu je aspirován přesný objem vzorku a činidla pomocí vícecestného selekčního ventilu do mísící cívky. Přepnutí ventilu a změna směru toku vede k promísení zóny vzorku a činidla. Když se vzniklá zóna dostane do detektoru, je zjištěn signál, jehož velikost je úměrná koncentraci látky ve vzorku [7].



Obrázek 2: Uspořádání SIA systému [8].

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

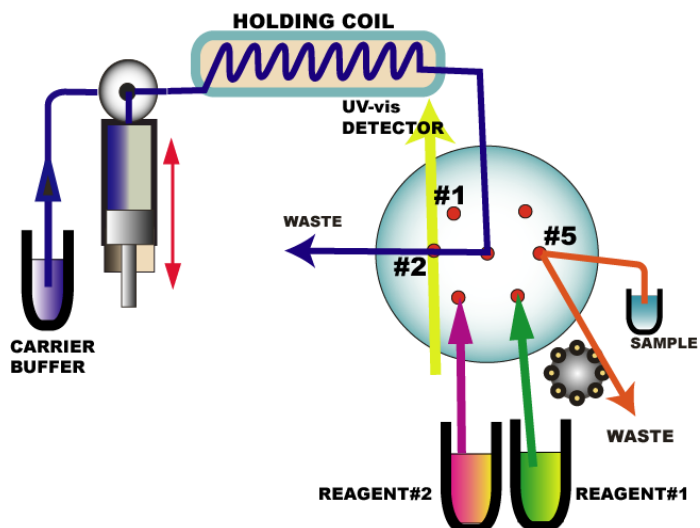
Během posledních 15 let se SIA ukázala jako výkonný a všestranný nástroj pro automatizaci různých analytických postupů. Bylo publikováno více než 500 článků a její výhody jsou často citovány v přehledech a vývojových člancích na poli analytické chemie.

SIA je spojena s velkou škálou detektorů, zahrnujících UV-VIS spektrofotometrii, fluorescenci, turbidimetrii, atomovou absorpci, emisní spektrofotometrii a elektrochemickou detekci. Technika je aplikována v různých chemických odvětvích jako je analýza kvality životní prostředí, farmacie, potravinářství, biotechnologie, radiochemie a metalurgie, kinetické studie chemických reakcí a stejně tak v průmyslovém monitoringu [7].

Sekvenční injekční analýza byla miniaturizována do Lab-on-valve uspořádání a stala se základem pro "bead injection" techniky (BI) a sekvenční injekční chromatografii (SIC) [8].

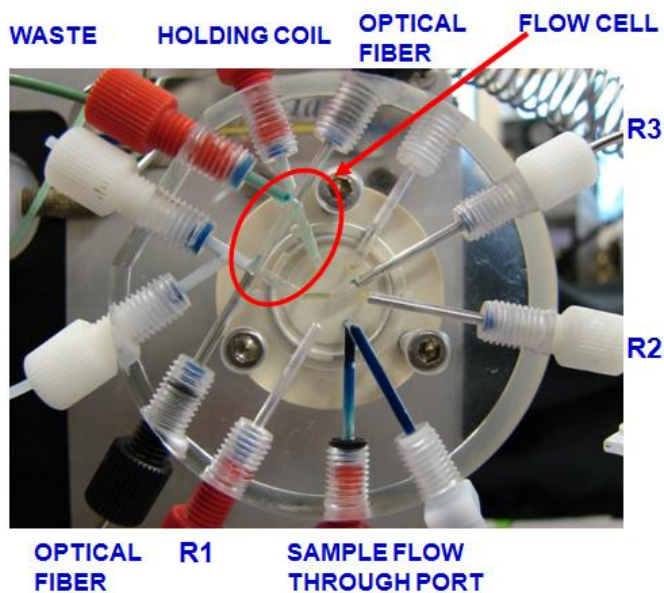
### **6.2.1 MicroSIA v Lab-on-valve uspořádání**

MicroSIA představuje zařízení SIA zmenšené do „Lab-on-valve“ (LOV) uspořádání, které vzniklo integrací průtokové cely a dalších komponentů (konektory, mikrokolony, průtok vzorku přes dávkovací port a mísící zařízení) do jednodílné konstrukce upevněné na vícecestný ventil. Toto uspořádání umožňuje miniaturizaci průtokového kanálu a tím i menší spotřebu vzorku a činidla. Typické objemy vzorku a činidla jsou mezi 5 a 25  $\mu\text{l}$ /analýzu a spotřeba nosného proudu je 100 - 250  $\mu\text{l}$ . Další výhodou LOV uspořádání je to, že přístrojové funkce jsou pro uživatele snadno srozumitelné. Pro rutinní analýzy je uspořádání snadno sestavitelné i v jiných laboratořích, takže pokud jsou sériové testy optimalizovány na jednom přístroji, zkušební protokol a jeho ovládací program mohou být bez úprav převedeny na jiné přístroje [8].



Obrázek 3: Uspořádání MicroSIA LOV [8].

Carrier buffer – nosný proud pufru, holding coil – mísící cívka, waste – odpad, reagent – činidlo, sample – vzorek, UV- VIS detector – UV – VIS detektor.



Obrázek 4: LOV modul [8].

Waste – odpad, holding coil – mísící cívka, flow cell – průtoková cela, optical fiber – optická vlákna, R1-3 – činidla, flow through port – průtokový dávkovací port.

LOV funkce pro zacházení s použitými roztoky:

- aspirace vzorku průtokovým dávkovacím portem
- aspirace činidel porty R1, R2 a R3
- centrální port spojený s mísicí cívkou
- odpadní port pro promytí LOV modulu
- kanál sloužící jako průtoková cela
- kanál pro vytvoření mikrokolony z polymerního materiálu
- LOV modul umožňuje použití „bead injection“ techniky

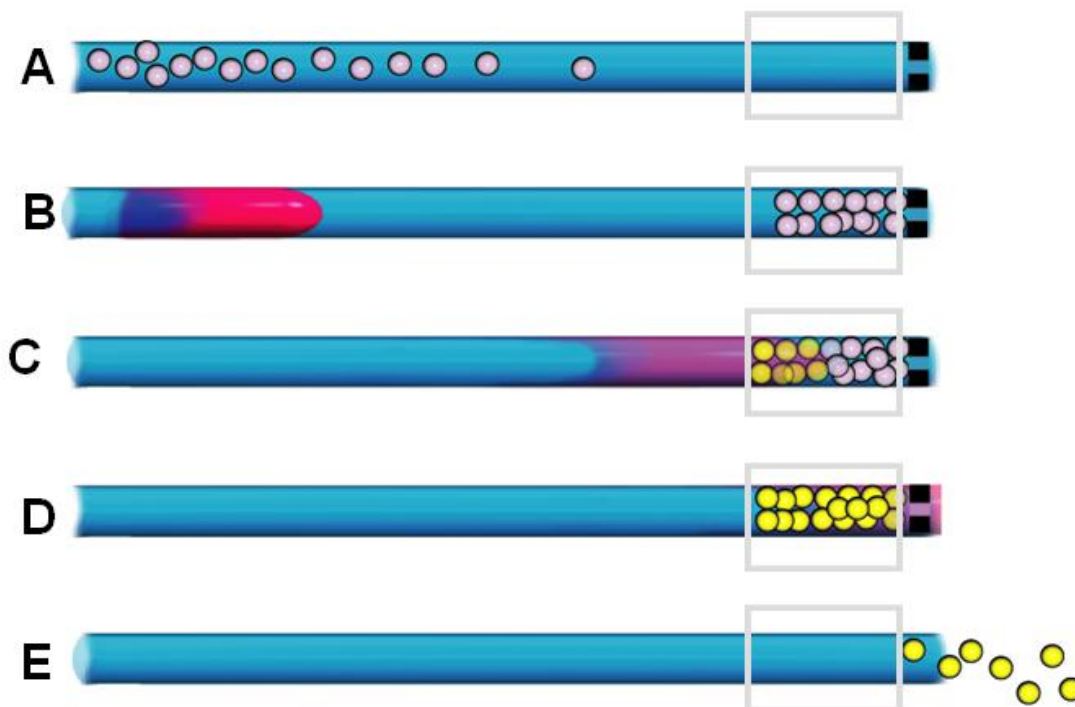
Průtoková cela může být konfigurována pro spektroskopické techniky pomocí optických vláken a pro elektrochemické aplikace pomocí vhodných elektrod. To umožňuje konfiguraci modulu LOV pro následující detekční techniky:

UV-VIS spektrofotometrie, fluorescence a chemiluminiscence, voltametrie, konduktometrie a potenciometrie.

Zařízení MicroSIA LOV je používáno jako základ u „bead injection“ technik [8].

### **6.2.2 „Bead injection“ techniky (BI)**

„Bead injection“ technika je další variantou průtokových metod. V té nejjednodušší formě jsou sferické částice (obr.č. 5A) aspirovány do LOV kanálu, kde jsou zachyceny v průtokové cele. Potom je aspirován vzorek (obr.č. 5B), který proniká přes vrstvu kuliček, zatímco jeho částí reagují s povrchovými funkčními skupinami mikrosfér (obr.č. 5C). Zadržené molekuly analytu jsou detekovány spektroskopicky nebo reakcí in-situ s vhodným barvivem či fluorescentním činidlem (obr.č. 5D). Na konci analýzy jsou kuličky odstraněny do odpadu (obr.č. 5E) [9].



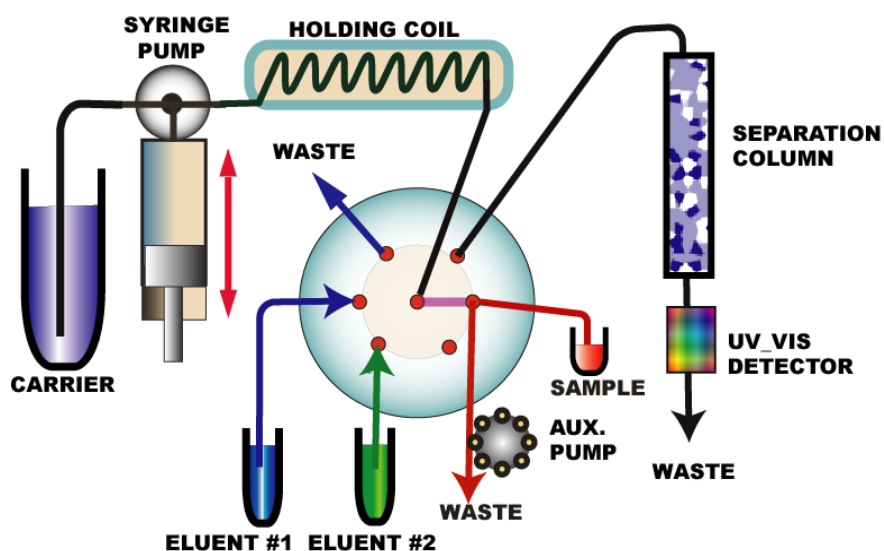
Obrázek 5: Pořadí kroků BI [8].

### 6.2.3 Sekvenční injekční chromatografie (SIC)

Sekvenční injekční chromatografie vznikla skloubením dvou technologií a to kapalinové chromatografie a sekvenční injekční analýzy. Kombinuje separační sílu kapalinové chromatografie a univerzálnost zpracování vzorku vlastní SI analýze. SIC je možné provádět na reverzní fázi, ionto-výměnnou, nebo afinitní chromatografií. Může být provedena na jednolitých kolonách za použití středotlakého čerpadla nebo na mikrokolonách pomocí konvenční nízkotlaké pístové pumpy.

SIC je založena na programovatelném toku, který umožňuje výběr objemu aspirovaného vzorku a jednoduchou tvorbu elučního gradientu. Výsledkem je zjednodušení přístrojů a snížení spotřeby činidel. U většiny aplikací je systém nejdříve naplněn mobilní fází, do které se pomocí obráceného toku nasává zóna vzorku směrem do mísící cívky. Poté se přepne vícecestný ventil z polohy „mísící cívka“ do polohy „kolona“, v tomto kroku je vzorek transportován na kolonu určenou pro separaci a následně do průtokové cely

detektoru. Programovatelnost toku umožňuje derivatizaci látek před vstupem do kolony, vytvoření elučního gradientu a regeneraci kolony [8].



Obrázek 6: Uspořádání SIC systému [8].

Carrier – nosný proud, syringe pump – pístová pumpa, holding coil – mísící cívka, waste – odpad, sample – vzorek, separation column – separační kolona, UV-VIS detector – UV-VIS detektor.



## 6.3 Chemiluminescence

Chemiluminiscenční procesy se dělí do dvou skupin.

První skupina zahrnuje metody, ve kterých je sám analyt emitující částicí během přímého vlivu silných oxidantů (hlavně manganistanu draselného, ale i jiných činidel jako jsou ceričité ionty nebo N-bromsukcinimid) – přímé CL metody.

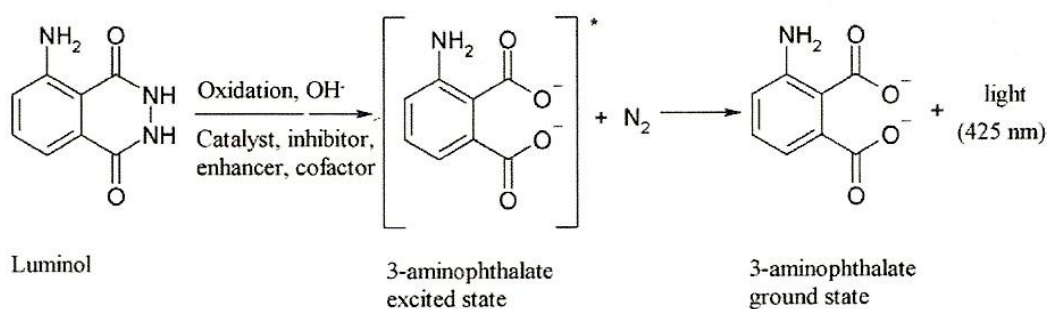
Druhou skupinou jsou CL metody nepřímé. Analyt interferuje různou cestou, např. jako katalyzátor nebo inhibitor, během oxidační reakce s chemiluminiscenčním prekurzorem jako je luminol, lucigenin [7].

### Nepřímé CL metody

- ✓ Systém s luminolem

Luminol (5-aminoftalylhydrazid) je nejfrekventovanějším CL činidlem. CL emise luminolu je založena na oxidaci peroxidem vodíku, hexakynoželezitanem, manganistanem draselným, N-bromsukcinimidem a dalšími činidly. Emitorem záření je excitovaný 3-aminoftalátový anion, jehož maximum emise se vyskytuje v 425 nm.

Důležitost luminolu jako analytického CL činidla nespočívá v jeho schopnosti záření, ale ve skutečnosti, že mnoho různých látek může ovlivňovat mechanismus a kinetiku reakce. Analyt může jednat jako zesilovač, inhibitor nebo katalyzátor, jehož koncentrace může ovlivňovat intenzitu a množství emitovaného záření [10].

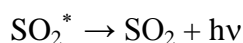
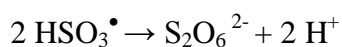


Obrázek 7: Chemiluminiscenční systém s luminolem [10].

Oxidation – oxidace; catalyst – katalyzátor; enhancer – zesilovač; cofactor – kofaktor; excited state – excitovaný stav; ground state – základní stav; light – světlo [10].

✓ Siřičitanový systém

Reakce siřičitanu se silnými oxidanty, jako je manganistan draselný, ceričité ionty v kyselém prostředí a elektrogenerované manganité ionty, je doprovázena slabou CL, která může být zesílena některými organickými sloučeninami. Excitovanou látkou vytvořenou oxidací siřičitanu je pravděpodobně oxid siřičitý, podle následujícího mechanismu reakce:



Energie excitovaného oxidu siřičitého může být lehce převedena na fluoreskující molekulu (fluorofor) [10].

### **Přímé CL metody**

✓ Oxidace manganistanem draselným

Manganistan draselný je nejpoužívanější oxidant v CL reakcích. Co je emitující molekula je zatím ve fázi diskuse [10].

Mnoho autorů uvádí, že spektrální rozlišení chemiluminiscence okyseleného manganistanu draselného je jednotný pás s pevným maximem mezi 610 nm a 750 nm a vycházející záření je červené.

Stanovená vlnová délka maxima záření byla  $734 \pm 5$  nm (nebo  $689 \pm 5$  nm jestliže byl použit hexametafosforečnan sodný) [11].

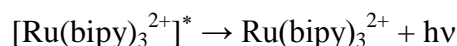
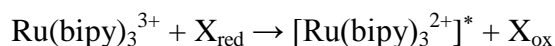
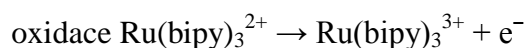
Nejpreferovanějším prostředím pro CL reakce  $\text{KMnO}_4$  je kyselina sírová a polyfosforečná. Optimalizace kyselého prostředí většinou ukáže, že užití kyseliny sírové vede k lepší opakovatelnosti. Role kyseliny polyfosforečné je dvojitá. Na jedné straně zajišťuje požadované kyselé prostředí, na druhé straně podporuje stabilizaci reakčních meziproductů. Přítomnost chemických přísad jako jsou senzitivizéry může zvýšit intenzitu záření dokonce o několik řádů. Některé surfaktanty (Tween 60, benzalkonium chlorid) chrání mikroprostředí CL zářiče před tvorbou micel nebo usnadní přechod energie. I jiné látky nesmáčivého charakteru, jako např.  $\beta$ -cyklodextrin, mohou chránit zářič a minimalizovat neelektromagnetické záření během relaxace excitovaných částic. Na druhé straně existuje mnoho látek, které mohou zvýšit intenzitu CL. Mnoho fluoroforů bylo testováno a navrženo v různých stanoveních. Chinin a kyselina mravenčí byly využity tam, kde energie z excitovaných meziproductů nebo produktů byla přenesena na konečný zářič (glutaraldehyd, formaldehyd). Cefalosporiny byly stanoveny  $\text{KMnO}_4$  indukovanou CL, zesílenou glyoxalem jako zesilovačem [10].

✓ Oxidace tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(III) komplexem ( $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$ )

Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(III) komplex je také poměrně využívaným CL činidlem.

Je to poměrně nestabilní molekula, která se připravuje čerstvě před analýzou nebo reakcí in situ. Různé metody dosahují aktivní molekuly  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$  oxidací (chemickou, fotochemickou a elektrochemickou) relativně stabilního komplexu  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ . Analyt je oxidován  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$  za vzniku excitovaného komplexu  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}]^*$  emitujícího CL záření v oblasti 600 nm.

CL vzniká reakcí s redukčním činidlem ( $\text{X}_{\text{red}}$ ) následovně:



K chemické oxidaci  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$  na  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$  se nejčastěji používá  $\text{Ce}(\text{IV})$  v kyselém prostředí, manganistan draselný v kyselém prostředí nebo  $\text{O}_2$  jako oxidant. Látky stanovené reakcí s  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$  ve své molekule typicky obsahují dusík (hlavně heterocyklické sloučeniny a primární, sekundární a terciární aminy) [10].

✓ Další CL reakce – elektrogenerované oxidanty

Některé CL reakce mohou probíhat na povrchu elektrod, jestliže CL činidlo je vyrobeno z pasivního prekurzoru v průtokovém systému. Tyto elektro-CL analýzy jsou charakterizovány dobrou citlivostí, ale mohou trpět některými nevýhodami jako je znečištění elektrod, úzký lineární rozsah způsobený malou plochou pracovní elektrody, špatnou opakovatelností a komplikovanou sestavou elektrochemické/CL průtokové cely. Mezi používané elektrogenerované oxidanty patří  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{Mn}(\text{III})$ ,  $\text{Ag}(\text{II})$ ,  $\text{Co}(\text{III})$  a  $[\text{Cu}(\text{HIO}_6)_2]^{5-}$  [10].

## **7 Experimentální část**

## 7.1 Použitá zařízení

1. Analytické váhy SARTORIUS 2004 MP, Německo
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. Ovládací program FaFSIA-Optim vytvořený na Katedře analytické chemie
5. Pístové čerpadlo Cavro XL 3000 s objemem 2,5 ml (Cavro Scientific Instruments Inc. USA)
6. Deseticestný selekční ventil VICI VALCO (Valco Instruments Co. Inc., USA)
7. Mísící cívka o objemu 1,2 ml z teflonové (PTFE) hadičky o průměru 0,75 mm
8. Fluorimetrický průtokový detektor model FS 970 (Schoeffel Instruments, USA)
9. Spojovací materiál – hadičky z teflonu (PTFE) o vnitřním průměru 0,50 a 0,75 mm (Watrex, Česká republika)

Přístroje č. 2-9 byly součástí sestavy průtokového systému SIA.

SIA systém se skládal z jednonábové vysoce přesné obousměrné pumpy, mísící cívky, vícecestného ventilu a průtokové cely fluorimetrického detektoru. Systém byl plněn nosným proudem, ve kterém byly zóna vzorku a zóny činidel postupně aspirovány do mísící cívky. Tyto vrstvy měly parabolický tvar, způsobený rozdíly mezi průtokovými rychlostmi uprostřed a na okrajích v průřezu hadičky průtokového systému. Pohyb zón v průtokovém systému a změny směru toku 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.

Pro chemiluminiscenci byl použit fluorimetr, upravený tak, že v místě sekundárního filtru byl vložen chemiluminiscenční modul a primární záření bylo vypnuto. Chemiluminiscenční modul se skládal ze stočené spirály z průhledné teflonové hadičky o vnitřním průměru 0,50 mm, s 5 závyty. Zóny činidel, vzorku a vznikajícího produktu reakce byly transportovány z vícecestného ventilu do středu spirály, vnějších částí spirály a následně ven do odpadu [12].

Napětí na fotonásobiči fluorimetrického detektoru bylo po dobu měření měněno podle použitých chemiluminiscenčních reakcí.

## 7.2 Použité chemikálie

- Metformin 97 %, Sigma-Aldrich, Německo
- Manganistan draselný, Balex Pardubice-Rosice n.L., ČR
- Kyselina sírová 96% p.a., Lachema Neratovice, ČR
- Kyselina šťavelová dihydrát p.a., Lachema Neratovice, ČR
- Ethanol 96%, denatur. methanolem, Lihovar Pardubice, ČR
- Síran ceričitý tetrahydrát puriss. p.a., Riedel-de Haën, Německo
- Tris(2,2'-bipyridyl)dichloro-ruthenium (II) hexahydrát 99,95%, Sigma-Aldrich, Německo
- Octan sodný, krystalický p.a., Lachema Neratovice, ČR
- Kyselina octová 99% p.a., Penta Chrudim, ČR
- N-bromsukcinimid, Reagent Plus 99%, Sigma-Aldrich, Německo
- Fluorescein, Fluka Chemika, Německo
- Cetyltrimethylamonium bromid, minimum 99%, Sigma-Aldrich, Německo
- Hydroxid sodný, Penta Chrudim, ČR

## 7.3 Základní a pracovní roztoky

Všechny základní roztoky byly uchovávány v chladu, roztok manganistanu draselného a cetyltrimethylamonium bromidu v chladu a temnu.



### **Základní roztok metforminu**

10 mM roztok metforminu: 0,04140 g metforminu bylo rozpouštěno v 25 ml odměrné baňce, rozpouštědlem byla voda nebo ethanol.

### **Pracovní roztoky metforminu**

1 mM roztok metforminu: 2,5 ml 10 mM roztoku metforminu bylo přeneseno do 25 ml odměrné baňky a zředěno vodou nebo ethanolem (50 % nebo 75 %).

0,1 mM roztok metforminu: 2,5 ml 1 mM roztoku metforminu bylo přeneseno do 25 ml odměrné baňky a zředěno vodou nebo ethanolem (50 % nebo 75 %).

0,01 mM roztok metforminu: 2,5 ml 0,1 mM roztoku metforminu bylo přeneseno do 25 ml odměrné baňky a zředěno vodou nebo ethanolem (50 % nebo 75 %).

1  $\mu$ M roztok metforminu: 2,5 ml 0,01 mM roztoku metforminu bylo přeneseno do 25 ml odměrné baňky a zředěno vodou nebo ethanolem (50 % nebo 75 %).

0,1  $\mu$ M roztok metforminu: 2,5 ml 1  $\mu$ M roztoku metforminu bylo přeneseno do 25 ml odměrné baňky a zředěno vodou nebo ethanolem (50 % nebo 75 %).

0,01  $\mu$ M roztok metforminu: 2,5 ml 0,1  $\mu$ M roztoku metforminu bylo přeneseno do 25 ml odměrné baňky a zředěno vodou nebo ethanolem (50 % nebo 75 %).

### **7.3.1 Systém metformin s manganistanem draselným a kyselinou sírovou**

#### **Základní roztoky činidel**

10 mM roztok manganistanu draselného: 0,03950 g manganistanu draselného bylo rozpouštěno v 25 ml odměrné baňce a doplněno destilovanou vodou.

1 M roztok kyseliny sírové: 1,4 ml koncentrované kyseliny sírové bylo zředěno a doplněno destilovanou vodou v 25 ml odměrné baňce.

### **Pracovní roztoky**

1 mM roztok manganistanu draselného vznikl zředěním 2,5 ml 10 mM roztoku manganistanu draselného v 25 ml odměrné baňce.

0,1 mM roztok manganistanu draselného vznikl zředěním 0,25 ml 10 mM roztoku manganistanu draselného v 25 ml odměrné baňce.

0,5 M roztok kyseliny sírové byl připraven z 12,5 ml 1 M kyseliny sírové v 25 ml odměrné baňce.

0,25 M roztok kyseliny sírové byl připraven z 12,5 ml 0,5 M kyseliny sírové v 25 ml odměrné baňce.

### **7.3.2 Chemiluminiscence metforminu v systému se síranem ceričitým a (tris(2,2'-bipyridyl)dichloro-ruthenium hexahydrátem**

#### **Základní roztoky činidel**

10 mM roztok tetrahydrátu síranu ceričitého: 0,10110 g síranu bylo rozpuštěno v 25 ml odměrné baňce a doplněno 50 mM kyselinou sírovou.

1 mM roztok hexahydrátu tris(2,2'-bipyridyl)dichloro-ruthenia(II): 0,01870 g komplexu Ru bylo rozpuštěno v 25 ml odměrné baňce a doplněno 50 mM kyselinou sírovou.

Octanový pufr o pH 5,54: 0,68040 g octanu sodného bylo rozpuštěno v 25 ml odměrné baňce a za stálého míchání na pH metru byla přidávána kyselina octová do pH 5,54.

0,4 M roztok octanu sodného: 1,3608 g octanu sodného bylo rozpuštěno v 25 ml odměrné baňce.

50 mM roztok kyseliny sírové: 5 ml 0,5 M kyseliny sírové bylo doplněno v 50 ml odměrné baňce.

### **Pracovní roztoky**

5 mM roztok tetrahydrátu síranu ceričitého: 12,5 ml 10 mM roztoku tetrahydrátu síranu ceričitého bylo přeneseno a doplněno v 25 ml odměrné baňce.

### **Příprava rozpouštědel**

50 % ethanol: 26,04 ml 96 % ethanolu bylo doplněno destilovanou vodou v 50 ml odměrné baňce.

75 % ethanol: 78,13 ml 96 % ethanolu bylo doplněno destilovanou vodou v 50 ml odměrné baňce.

## **7.3.3 Chemiluminiscence metforminu v systému s N-bromsukcinimidem a fluoresceinem**

### **Základní roztoky činidel**

$10^{-3}$  g/ml roztok metforminu: 0,025 g metforminu bylo rozpuštěno v 25 ml odměrné baňce.

$1 \cdot 10^{-2}$  M roztok metforminu: 0,04141 g metforminu bylo rozpuštěno v 25 ml odměrné baňce.

0,01 M roztok N-bromsukcinimidu (NBS): 0,08899 g NBS bylo rozpuštěno v 50 ml odměrné baňce z tmavého skla a doplněno destilovanou vodou.

5 mM roztok fluoresceinu: 0,08308 g fluoresceinu bylo rozpuštěno v 50 ml odměrné baňce a doplněno 0,05 M hydroxidem sodným.

2,5  $\mu$ M roztok cetyltrimethylamonium bromidu (CTAB): 0,04556 g CTAB bylo rozpuštěno v 50 ml odměrné baňce a doplněno destilovanou vodou.

0,05 M hydroxid sodný: 0,20000 g NaOH bylo rozpuštěno ve 100 ml odměrné baňce a doplněno destilovanou vodou.

## Pracovní roztoky

0,5 mM roztok fluoresceinu: 1 ml 5 mM roztoku fluoresceinu bylo naředěno v 10 ml odměrné baňce a doplněno destilovanou vodou.

0,05 mM roztok fluoresceinu: 0,1 ml 5 mM roztoku fluoresceinu bylo naředěno v 10 ml odměrné baňce a doplněno destilovanou vodou.

$10^{-4}$  g/ml roztok metforminu: připraven z 1 ml  $10^{-3}$  g/ml roztoku metforminu v 10 ml odměrné baňce.

$10^{-5}$  g/ml roztok metforminu: připraven z 1 ml  $10^{-4}$  g/ml roztoku metforminu v 10 ml odměrné baňce.

$10^{-6}$  g/ml roztok metforminu: připraven z 1 ml  $10^{-5}$  g/ml roztoku metforminu v 10 ml odměrné baňce.

$10^{-7}$  g/ml roztok metforminu: připraven z 1 ml  $10^{-6}$  g/ml roztoku metforminu v 10 ml odměrné baňce.

$10^{-8}$  g/ml roztok metforminu: připraven z 1 ml  $10^{-7}$  g/ml roztoku metforminu v 10 ml odměrné baňce.

$10^{-9}$  g/ml roztok metforminu: připraven z 1 ml  $10^{-8}$  g/ml roztoku metforminu v 10 ml odměrné baňce.

$5 \cdot 10^{-3}$  M roztok metforminu: připraven z 12,5 ml  $1 \cdot 10^{-2}$  M roztoku metforminu v 25 ml odměrné baňce.

$2 \cdot 10^{-3}$  M roztok metforminu: připraven z 10 ml  $5 \cdot 10^{-3}$  M roztoku metforminu v 25 ml odměrné baňce.

$1 \cdot 10^{-3}$  M roztok metforminu: připraven z 5 ml  $5 \cdot 10^{-3}$  M roztoku metforminu v 25 ml odměrné baňce.

$5 \cdot 10^{-4}$  M roztok metforminu: připraven z 12,5 ml  $1 \cdot 10^{-3}$  M roztoku metforminu v 25 ml odměrné baňce.

$2 \cdot 10^{-4}$  M roztok metforminu: připraven z 10 ml  $5 \cdot 10^{-4}$  M roztoku metforminu v 25 ml odměrné baňce.

$1 \cdot 10^{-4}$  M roztok metforminu: připraven z 5 ml  $5 \cdot 10^{-4}$  M roztoku metforminu v 25 ml odměrné baňce.

$5 \cdot 10^{-5}$  M roztok metforminu: připraven z 12,5 ml  $1 \cdot 10^{-4}$  M roztoku metforminu v 25 ml odměrné baňce.

$1 \cdot 10^{-5}$  M roztok metforminu: připraven z 5 ml  $5 \cdot 10^{-5}$  M roztoku metforminu v 25 ml odměrné baňce.

$5 \cdot 10^{-6}$  M roztok metforminu: připraven z 12,5 ml  $1 \cdot 10^{-5}$  M roztoku metforminu v 25 ml odměrné baňce.

$1 \cdot 10^{-6}$  M roztok metforminu: připraven z 5 ml  $5 \cdot 10^{-6}$  M roztoku metforminu v 25 ml odměrné baňce.

$1 \cdot 10^{-7}$  M roztok metforminu: připraven z 2,5 ml  $1 \cdot 10^{-6}$  M roztoku metforminu v 25 ml odměrné baňce.

## **7.4 Optimalizace metody**

### **7.4.1 Chemiluminiscence metforminu v systému s manganistanem draselným a kyselinou sírovou**

Průtoková rychlost a objemy a koncentrace činidel byly optimalizovány 10 mM roztokem metforminu. Schéma měřicího cyklu bylo optimalizováno 1 mM roztokem metforminu.

### 7.4.1.1 Optimalizace jednotlivých parametrů

#### Průtoková rychlost

Byla hledána hodnota průtokové rychlosti, při které by byl chemiluminiscenční signál nejvyšší. Rychlost průtoku se pohybovala v rozmezí 25-100  $\mu\text{l/s}$ .

#### Objemy a koncentrace činidel

Snahou bylo zajistit nejvyšší hodnotu chemiluminiscenčního signálu nalezením nejoptimálnějších hodnot objemu a koncentrace jednotlivých činidel.

Tabulka 1: Rozsah koncentrací a dávkovaných objemů činidel.

Činidlo	Aspirovaný objem [ $\mu\text{l}$ ]	Koncentrace [M]
Manganistan draselný	10 - 60	$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-2}$
Kyselina sírová	30 - 100	0,25 - 1
Metformin	10 - 50	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-2}$

#### Schéma měřicího cyklu

Cílem bylo zajistit nejvhodnější pořadí činidel tak, aby byla hodnota chemiluminiscenčního signálu co nejvyšší. Testovány byly tyto sekvence :

- 1)  $\text{KMnO}_4$ , metformin,  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- 2)  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , metformin,  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- 3)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KMnO}_4$ , metformin,  $\text{H}_2\text{SO}_4$

## **7.4.2 Chemiluminiscence metforminu v systému se síranem ceričitým a (tris(2,2'-bipyridyl)dichloro-rutheniem**

Optimalizace byla prováděna s 0,1 mM a 1 mM roztokem metforminu.

### **7.4.2.1 Optimalizace jednotlivých parametrů**

#### **Použitá rozpouštědla**

Byla testována rozpouštědla, ve kterých byly připraveny pracovní roztoky metforminu, a zjišťovalo se, u kterých roztoků je hodnota chemiluminiscenčního signálu nejvyšší (50 % ethanol, 75 % ethanol, destilovaná voda).

#### **Koncentrace činidel**

Snahou bylo zajistit co nejvyšší chemiluminiscenční signál nalezením optimálních hodnot koncentrací síranu ceričitého a zhodnotit, zda je výhodnější užití octanového pufru o pH 5,54 nebo 0,4 M octanu sodného.

#### **Průtoková rychlost a struktura cyklu**

Bylo vyhledáno nejvhodnější pořadí činidel a taková průtoková rychlost, aby bylo dosaženo nejvyšší hodnoty chemiluminiscenčního signálu. Průtoková rychlost se pohybovala v rozmezí 50-120  $\mu\text{l/s}$ .

#### **Objemy činidel**

Cílem bylo najít hodnoty objemu činidel tak, aby velikost chemiluminiscenčního signálu byla co nejvyšší.

Tabulka 2: Rozsah dávkovaných objemů činidel.

Činidlo	Aspirovaný objem [ $\mu\text{l}$ ]
Ce(IV)	5 - 40
Ru(II)	10 - 70
Octan sodný	10 - 50

### 7.4.3 Chemiluminiscence metforminu v systému s N-bromsukcinimidem a fluoresceinem

Během optimalizace byl používán roztok metforminu o koncentraci  $1 \times 10^{-3}$  g/ml ( $6 \times 10^{-3}$  mM).

#### 7.4.3.1 Optimalizace jednotlivých parametrů

Koncentrace N-bromsukcinimidu a fluoresceinu vycházely z údajů vyhledaných v odborné literatuře [1]. Ostatní parametry (objemy aspirovaných zón činidel, průtoková rychlost transportu zóny produktu do průtokové cely detektoru) byly nalezeny automaticky s využitím programu FaFSIAOptim, vytvořeným na Katedře analytické chemie.

Tento program umožňuje automatický přenos naměřených hodnot do výpočtu kombinace dalšího optimalizačního kroku metodou Simplex. Tyto hodnoty jsou automaticky převzaty do ovládacího programu, který provede měření, a výsledek je opět přenesen do optimalizační části programu. Takto jsou automaticky proměřeny kombinace všech optimalizovaných parametrů současně, takže počet měření nutných k získání optimálních podmínek reakce je výrazně nižší, než při postupné optimalizaci jednotlivých parametrů zvlášť (princip optimalizace pomocí Simplex metody). Zároveň



je automatizací celého postupu zjednodušen přenos dat mezi optimalizační částí a ovládacím programem průtokového systému.

Využití tohoto automatického optimalizačního postupu nebylo u předchozích testování možné kvůli nutnosti odečítání hodnoty slepého pokusu, který by se musel měřit u každé navržené kombinace optimalizovaných parametrů a pro celkové hodnocení by musel být použit rozdíl hodnot intenzity chemiluminiscence měřeného a slepého roztoku.

### **Schéma cyklu**

Byla vyzkoušena různá schémata (pořadí aspirovaných zón a jejich promísení) s cílem najít takové, při kterém by hodnota chemiluminiscenčního signálu byla nejvyšší.

## **7.5 Kalibrační závislosti**

Kalibrační závislosti byly proměřeny u systému metforminu s N-bromsukcinimidem a fluoresceinem v koncentračním rozsahu roztoku metforminu od  $10^{-7}$  do  $10^{-2}$  M v 12-ti kalibračních bodech. Byl zjištěn typ kalibrační závislosti a detekční a kvantifikační limity.

## **7.6 Opakovatelnost**

Opakovatelnost byla proměřena na dvou koncentračních hladinách, s roztoky metforminu o koncentraci  $10^{-4}$  a  $10^{-3}$  M. Měření bylo provedeno 10-krát. Byl zjištěn průměr, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka.

## **8 Výsledky a diskuse**

## 8.1 Optimalizace metody

Cílem optimalizace bylo najít co nejvhodnější podmínky pro stanovení metforminu sekvenční injekční analýzou s chemiluminiscenční detekcí.

### 8.1.1 Výsledky optimalizace u systému metforminu s manganistanem draselným a kyselinou sírovou

Na fotonásobiči bylo použito během celého měření napětí 420 V.

#### 8.1.1.1 Průtoková rychlost

Hodnoty chemiluminiscenčního signálu byly měřeny pro průtokové rychlosti 25, 50, 80 a 100  $\mu\text{l/s}$ , avšak pohybovaly se pouze v oblasti šumu, takže nebylo možné jejich automatické zpracování.

Vizuálně měl nejvyšší hodnotu chemiluminiscenční signál získaný při průtokové rychlosti 80  $\mu\text{l/s}$ .

#### 8.1.1.2 Objemy a koncentrace činidel

U 10 mM manganistanu draselného byly testovány velikosti objemů 5, 10, 20, 30, 60  $\mu\text{l}$ .

Velikosti chemiluminiscenčních signálů se pohybovaly opět v oblasti šumu (citlivost detektoru – 0,02  $\mu\text{A}$ ).

Vizuálně měl nejvyšší hodnotu chemiluminiscenční signál při objemu 10  $\mu\text{l}$ .

U **1 M kyseliny sírové** byly testovány velikosti objemů 30, 70, 80 a 100  $\mu\text{l}$ .

Velikosti chemiluminiscenčních signálů se pohybovaly opět v oblasti šumu (citlivost detektoru – 0,02  $\mu\text{A}$ ).

Vizuálně měl nejvyšší hodnotu signál při objemu 100  $\mu\text{l}$ .

U **10 mM metforminu** byly testovány velikosti objemů 10, 30, 40 a 50  $\mu\text{l}$ .

Velikosti chemiluminiscenčních signálů se pohybovaly v oblasti šumu (citlivost detektoru – 0,02  $\mu\text{A}$ ).

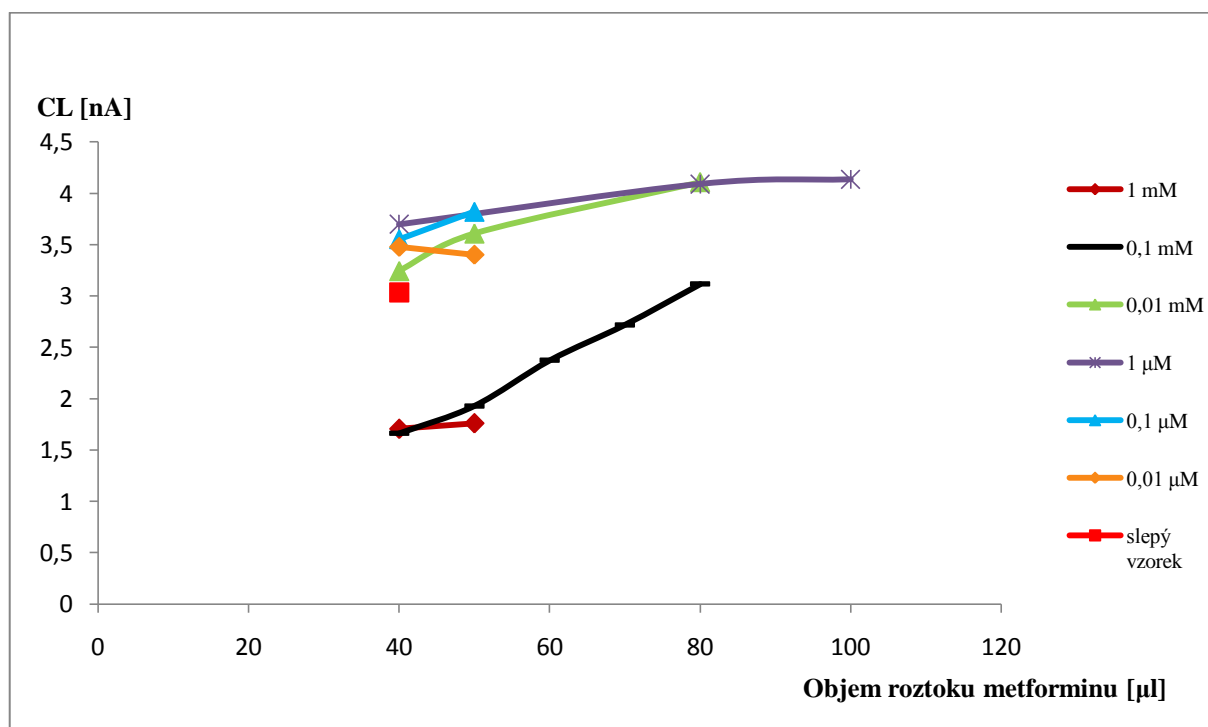
Jediný změřený signál byl nalezen u objemu 40  $\mu\text{l}$  - 0,156 ( velikost CL 1,248 nA).

Protože výška píků byla velice malá a v literatuře byla nalezena práce, ve které byly měřeny daleko nižší koncentrace metforminu, byly zkoušeny různé objemy s jeho nižší koncentrací, aby bylo možno otestovat, zda se chemiluminiscenční signál roztoku metforminu o koncentraci 10 mM v kalibrační křivce již nenachází ve fázi plató.

Tabulka 3: Vliv objemu a koncentrace roztoků metforminu.

Koncentrace roztoku metforminu [mM]	Objem roztoku metforminu [ $\mu\text{l}$ ]	Výška signálu	CL [nA]
1	40	0,4269	1,7076
	50	0,4402	1,7608
0,1	40	0,2077	1,6616
	50	0,2412	1,9296
	60	0,2966	2,3728
	70	0,3400	2,7200
	80	0,3895	3,1160
0,01	40	0,4056	3,2448
	50	0,4512	3,6096
	80	0,5137	4,1096
0,001	40	0,4623	3,6984

Koncentrace roztoku metforminu [mM]	Objem roztoku metforminu [ $\mu$ l]	Výška signálu	CL [nA]
	80	0,5112	4,0896
	100	0,5168	4,1344
0,0001	40	0,4440	3,5520
	50	0,4776	3,8208
0,00001	40	0,4348	3,4784
	50	0,4252	3,4016
slepý vzorek	40	0,3791	3,0328



Obrázek 8: Srovnání signálů u různých objemů a koncentrací roztoku metforminu.

Výška slepého signálu byla příliš vysoká, proto byly hadičky průtokového systému propláchnuty kyselinou šťavelovou do zmenšení hodnoty slepého vzorku z původní hodnoty až na 0,2685 při citlivosti detektoru 0,01  $\mu$ A. Hodnota CL 1,074 nA.

Kvůli problémům s výškou slepého signálu byly znovu proměřeny některé pracovní roztoky metforminu při použití zóny činidla o objemu 40  $\mu\text{l}$ , protože ten byl určen z prvního měření jako nejlepší. Po každém jednotlivém měření byly hadičky propláchnuty kyselinou šťavelovou – krok promytí průtokového systému byl zařazen přímo do ovládacího programu pro měření jednotlivých roztoků.

Tabulka 4: Proměření intenzity chemiluminiscence po propláchnutí kys. šťavelovou.

Koncentrace roztoku metforminu [mmol/l]	Výška píku	CL [nA]
1	0,2793	1,1172
0,1	0,2717	1,0868
0,01	0,2968	1,1872
0,001	0,2897	1,1588
Slepý signál	0,2688	1,0752

Citlivost detektoru 0,01  $\mu\text{A}$ .

Po průplachu hadiček kyselinou šťavelovou se zmenšil signál u všech koncentrací metforminu. Po odečtení slepého signálu však byla výsledná hodnota CL blízká nule. Nevyhovující byla i citlivost detektoru, která se už nedala zvýšit.

Aby se zjistilo, zda se na materiálu hadiček průtokového systému neadsorbují použítá činidla, byla vyměněna celá průtoková cela a znovu byl změřen slepý signál.

Nejnižší slepý signál mělo schéma s 10  $\mu\text{l}$  10 mM roztoku manganistanu draselného s 60  $\mu\text{l}$  0,25 M roztoku kyseliny sírové.

Avšak měření 40  $\mu\text{l}$  1 mM roztoku metforminu mělo při citlivosti detektoru 0,01  $\mu\text{A}$  výšku pouze 4-násobku šumu základní linie detektoru.

### 8.1.1.3 Schéma měřicího cyklu

Původní schéma manganistan draselný, metformin, kyselina sírová bylo upraveno:

- a) 10  $\mu\text{l}$  10 mM manganistanu draselného, 30  $\mu\text{l}$  0,25 M kyseliny sírové, 40  $\mu\text{l}$  1 mM metforminu, 30  $\mu\text{l}$  0,25 M kyseliny sírové při citlivosti detektoru 0,01  $\mu\text{A}$  – 3-násobek šumu
- b) 30  $\mu\text{l}$  0,25 M kyseliny sírové, 10  $\mu\text{l}$  10 mM manganistanu draselného, 40  $\mu\text{l}$  1 mM metforminu, 30  $\mu\text{l}$  0,25 M kyseliny sírové při citlivosti detektoru 0,01  $\mu\text{A}$  – 3-násobek šumu
- c) 10  $\mu\text{l}$  10 mM manganistanu draselného, 40  $\mu\text{l}$  10 mM metforminu, 30  $\mu\text{l}$  0,25 M kyseliny sírové při citlivosti detektoru 0,01  $\mu\text{A}$  – píky byly větší než u 1 mM roztoku metforminu, ale stále nebyly detektorem vyhodnoceny.

Vzorky byly nasávány do mísící cívky rychlostí 100  $\mu\text{l/s}$ , pak byly aspirovány v pořadí a objemech dle příslušného schématu, do detektoru byla použita rychlost 80  $\mu\text{l/s}$ .

Protože z měření CL metforminu v systému s manganistanem draselným a kyselinou sírovou nebyly získány prakticky využitelné výsledky, tento systém nebyl dále testován.

## 8.1.2 Výsledky optimalizace u systému metforminu se síranem ceričitým a (tris(2,2'-bipyridyl)dichloro-rutheniem

### 8.1.2.1 Použitá rozpouštědla

Tento systém vycházel z článku [13], ve kterém byla účinná látka (indometacin) měřena v ethanolickém roztoku, proto se i u metforminu zkoušelo jiné rozpouštědlo než voda, a to 50 % a 75 % ethanol.

Tabulka 5: Závislost intenzity chemiluminiscenčního signálu 0,1 mM metforminu na použitém rozpouštědle.

Rozpouštědlo	Velikost signálu	Slepý signál	Po odečtení slepého signálu	CL [nA]
voda	2,1961	2,2325	- 0,0364	- 14,56
50 % ethanol	2,0388	1,8808	0,1580	63,20
75 % ethanol	1,8312	1,7254	0,1058	42,32

Citlivost detektoru 1,0  $\mu$ A. Pořadí činidel: 70  $\mu$ l 10 mM Ce(IV), 30  $\mu$ l 1mM Ru, 30  $\mu$ l pufru o pH 5,54, 15  $\mu$ l 0,1 mM metforminu, průtoková rychlost 100  $\mu$ l/s.

Nejvyšší chemiluminiscenční signál měl roztok metforminu připravených v 50 % ethanolu, proto byl dále používán.

Protože byly získané signály ve formě píků vysoké (při nejnižší citlivosti detektoru měly hodnotu vyšší než 1, takže by mohlo dojít k chybě při měření), bylo sníženo napětí na fotonásobiči detektoru (z 420 V na 330 V).



Tabulka 6: Orientační proměření kalibrační závislosti roztoku metforminu v 50 % ethanolu.

Koncentrace roztoku metforminu [mM]	Velikost signálu	Po odečtení slepého signálu	CL [nA]
10	0,7488	0,0700	5,60
1	0,9588	0,2800	22,40
0,1	0,6594	- 0,0190	1,55
0,01	0,7042	0,0250	2,00
0,001	0,7157	0,0370	2,96
0,0001	0,7471	0,0680	5,44
Slepý vzorek	0,6788		

Citlivost detektoru 0,2  $\mu$ A. Pořadí činidel: 70  $\mu$ l 10 mM Ce(IV), 30  $\mu$ l 1mM Ru, 30  $\mu$ l pufru o pH 5,54, 15  $\mu$ l 0,1 mM metforminu, průtoková rychlost 100  $\mu$ l/s.

Velikost slepého signálu je hodně vysoká a podstatný rozdíl velikosti chemiluminiscenčního signálu byl nalezen pouze pro 1 M standard metforminu.

### 8.1.2.2 Koncentrace činidel

K měření byl používán roztok metforminu připravený v 50 % ethanolu.

**Koncentrace tetrahydrátu síranu ceričitého při chemiluminiscenční reakci v prostředí pufru o pH 5,54:**

#### A) 10 mM roztok ceričitých iontů

Tabulka 7: Vliv objemu 10 mM roztoku ceričitých iontů na velikost signálu.

Objem 10 mM roztoku ceričitých iontů	Koncentrace roztoku metforminu [mM]	Velikost signálu	Po odečtení slepého signálu	CL [nA]
30	10	0,3426	0,032	6,40
	1	0,3971	0,086	17,20
	0,01	0,3529	0,042	8,40
	Slepý vzorek	0,3111		
70	10	0,3078	0,001	0,20
	1	0,4517	0,145	29,00
	0,01	0,3403	0,034	6,80
	Slepý vzorek	0,3067		

Citlivost detektoru 0,5  $\mu$ A.

### B) 5 mM roztok ceričitých iontů

Tabulka 8: Vliv objemu 5 mM roztoku ceričitých iontů na velikost signálu.

Objemy 5 mM roztoku ceričitých iontů	Koncentrace roztoku metforminu [mM]	Velikost signálu	Po odečtení slepého signálu	CL [nA]
30	10	0,3270	0,024	1,92
	1	0,3784	0,076	6,08
	0,01	0,3390	0,036	2,88
	Slepý vzorek	0,3027		
70	10	0,4336	-0,067	-5,36
	1	0,5038	0,004	0,32
	0,01	0,4869	-0,013	-1,04
	Slepý vzorek	0,5003		

Citlivost detektoru 0,2  $\mu$ A.

**Koncentrace tetrahydrátu síranu ceričitého při chemiluminiscenční reakci v prostředí 0,4 M octanu sodného:**

**A) 10 mM roztok ceričitých iontů**

Tabulka 9: Vliv objemu 10 mM roztoku ceričitých iontů na velikost signálu.

Objemy 10 mM roztoku ceričitých iontů	Koncentrace roztoku metforminu [mM]	Velikost signálu	Po odečtení slepého signálu	CL [nA]
<b>30</b>	10	0,5732	0,076	6,08
	<b>1</b>	<b>1,0054</b>	<b>0,508</b>	<b>40,64</b>
	0,01	0,5098	0,013	1,04
	Slepý vzorek	0,4973		
70	10	0,5630	0,065	5,20
	1	0,9977	0,499	39,92
	0,01	0,5175	0,019	1,52
	Slepý vzorek	0,4985		

Citlivost detektoru 0,2  $\mu$ A.

**B) 5 mM roztok ceričitých iontů**

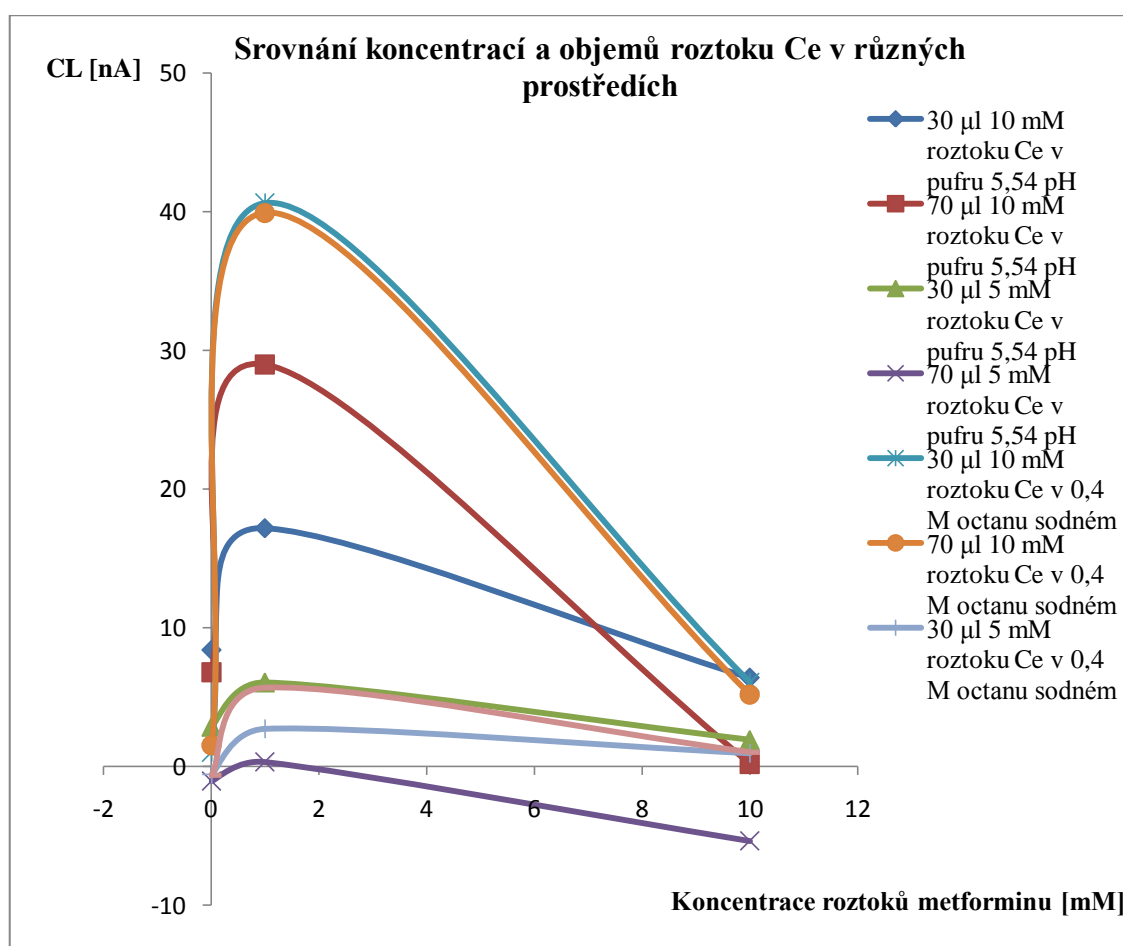
Tabulka 10: Vliv objemu 5 mM roztoku ceričitých iontů na velikost signálu.

Objemy 5 mM roztoku ceričitých iontů	Koncentrace roztoku metforminu [mM]	Velikost signálu	Po odečtení slepého signálu	CL [nA]
30	10	0,2194 <sup>A</sup>	0,012	0,96
	1	0,2418 <sup>A</sup>	0,034	2,72
	0,01	0,4016 <sup>B</sup>	-0,014	-0,56

Objemy 5 mM roztoku ceričitých iontů	Koncentrace roztoku metforminu [mM]	Velikost signálu	Po odečtení slepého signálu	CL [nA]
	Slepý vzorek	0,4152 <sup>B</sup>		
70	10	0,2807 <sup>A</sup>	0,013	1,04
	1	0,3380 <sup>A</sup>	0,071	5,68
	0,01	0,5187 <sup>B</sup>	-0,016	-0,64
	Slepý vzorek	0,5349 <sup>B</sup>		

A) Citlivost detektoru 0,2  $\mu$ A.

B) Citlivost detektoru 0,1  $\mu$ A



Obrázek 9: Srovnání vlivu koncentrací a objemů roztoku Ce v různých prostředích na CL signál.

Nejvyšší CL signál byl získán při měření s 30 $\mu$ l 10 mM roztoku ceričitých iontů v prostředí s 0,4 M octanem sodným.

### **8.1.2.3 Průtoková rychlost a struktura cyklu**

Předchozí pokusy probíhaly při aspiraci roztoků v pořadí:

- 30  $\mu$ l 10 mM roztoku ceričitých iontů
- 30  $\mu$ l 1 mM roztoku ruthenia
- 30  $\mu$ l 0,4 M roztoku octanu sodného
- 15  $\mu$ l 1 mM roztoku metforminu
- rychlost 100  $\mu$ l/s
- 330 V, citlivost detektoru 0,1 – 0,5  $\mu$ A

Dále bylo vyzkoušeno 5 různých schémat měření, ve kterých se měnilo pořadí činidel, vzorku a zkoumal se vliv promísení na velikost signálu.

První schéma bylo bez promísení s pořadím činidel:

- 30  $\mu$ l 10 mM roztoku ceričitých iontů
- 30  $\mu$ l 1 mM roztoku ruthenia
- 15  $\mu$ l 1 mM roztoku metforminu
- 30  $\mu$ l 0,4 M roztoku octanu sodného

U tohoto schématu byl slepý signál vyšší než signál vzorku. Proto byla zkoušena další schémata s mísením činidel.

Schéma č. 2 mělo stejné pořadí jako schéma 1, ale došlo k promísení ceričitých iontů a roztoku ruthenia a až potom byl nasát metformin a octan sodný. Bohužel slepý signál byl opět vyšší než signál vzorku a byl dvojitý.

Ve třetím schématu bylo zachováno pořadí činidel jako u druhého schématu, ale ještě bylo přidáno další mísení na konec cyklu.

Velikost píku vzorku po odečtení sepého signálu byla 0,2910 → CL 58,2 nA

U čtvrtého schématu se zachovala první polovina cyklu tj. ceričité ionty, roztok ruthenia, promísení, ale vyměnilo se pořadí octanu sodného a metforminu. Velikost slepého signálu se sice snížila, ale pík vzorku byl dvojitý.

Po vyzkoušení různých schémat a promísení bylo vybráno schéma původní, protože neposkytovalo dvojité píky, slepý signál byl nižší a analýza netrvala tak dlouho jako některá schémata s několikanásobným mísením.

U vybraného schématu byly vyzkoušeny různé průtokové rychlosti transportu produktu do detektoru:

Tabulka 11: Vliv průtokové rychlosti.

Průtoková rychlost [μl/s]	Výška signálu	Po odečtení slepého signálu	CL [nA]
120	0,5923	0,2925	58,50
110	0,6029	0,3031	60,62
100	0,6534	0,3536	70,72
90	0,6287	0,3289	65,78
80	0,6331	0,3333	66,66
70	0,6910	0,3912	78,24
60	0,7342	0,4344	86,88
<b>50</b>	<b>0,8120</b>	<b>0,5122</b>	<b>102,44</b>
40	0,8084	0,5086	101,72
Slepý signál	0,2998		

Nejvyšší signál měla rychlost 50 μl/s, avšak opakovatelnost se během měření nezdála příliš dobrá, proto byla otestována.

Opakovatelnost 50  $\mu\text{l/s}$ :

Číslo měření/rychlost [ $\mu\text{l/s}$ ]	50
1	0,7647
2	0,7823
3	0,7972
4	0,7811
5	0,7894
6	0,7870
7	0,7814
8	0,7873
9	0,7870
<b>průměr</b>	<b>0,7841</b>
<b>SD</b>	<b>0,0088</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>1,12</b>

Získaný výsledek testování opakovatelnosti byl uspokojivý, relativní směrodatná odchylka byla 1,12 %.

Ještě jednou bylo vyzkoušeno mísení, tentokrát po aspiraci všech činidel, v pořadí stejném jako u předchozího měření, byla přidána 50  $\mu\text{l}$  zóna vody, vše promícháno a transportováno do detektoru. Rychlost pohybu do detektoru byla testována v rozmezí 60-120  $\mu\text{l/s}$ :

Tabulka 12: Průtoková rychlost po promísení.

Průtoková rychlost [ $\mu\text{l/s}$ ]	Výška signálu	Po odečtení slepého signálu	CL [nA]
120	0,5320	0,2308	46,16
110	0,5665	0,2653	53,06
100	0,5720	0,2708	54,16
90	0,5827	0,2815	56,30
<b>80</b>	<b>0,6095</b>	<b>0,3083</b>	<b>61,66</b>

Průtoková rychlost [μl/s]	Výška signálu	Po odečtení slepého signálu	CL [nA]
70	0,6012	0,3000	60,00
60	0,5900	0,2888	57,76
Slepý signál	0,3012		

Nejvyšší signál měla rychlost 80 μl/s, se kterou byla otestována opakovatelnost měření.

Opakovatelnost 80 μl/s s mísením:

Číslo měření/rychlost [μl/s]	80
1	0,6142
2	0,6016
3	0,6023
4	0,6011
5	0,6043
6	0,6083
7	0,6090
8	0,6070
9	0,6165
<b>průměr</b>	<b>0,6071</b>
<b>SD</b>	<b>0,0055</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,90</b>

Při přeměření byla získána vynikající opakovatelnost, relativní směrodatná odchylka byla 0,90 %.

Pro další měření bylo vybráno schéma bez mísení s rychlostí 50 μl/s, protože v tomto případě byl získán vyšší signál, měření bylo rychlejší a obě hodnoty opakovatelnosti byli přijatelné.



#### 8.1.2.4 Objemy činidel

Měření probíhalo podle vybraného schématu s rychlostí transportu do detektoru 50  $\mu\text{l/s}$ :

- 30  $\mu\text{l}$  10 mM roztoku ceričitých iontů
- 30  $\mu\text{l}$  1 mM roztoku ruthenia
- 15  $\mu\text{l}$  1 mM roztoku metforminu
- 30  $\mu\text{l}$  0,4 M roztoku octanu sodného
- rychlost 50  $\mu\text{l/s}$
- 330 V, citlivost detektoru 0,5  $\mu\text{A}$

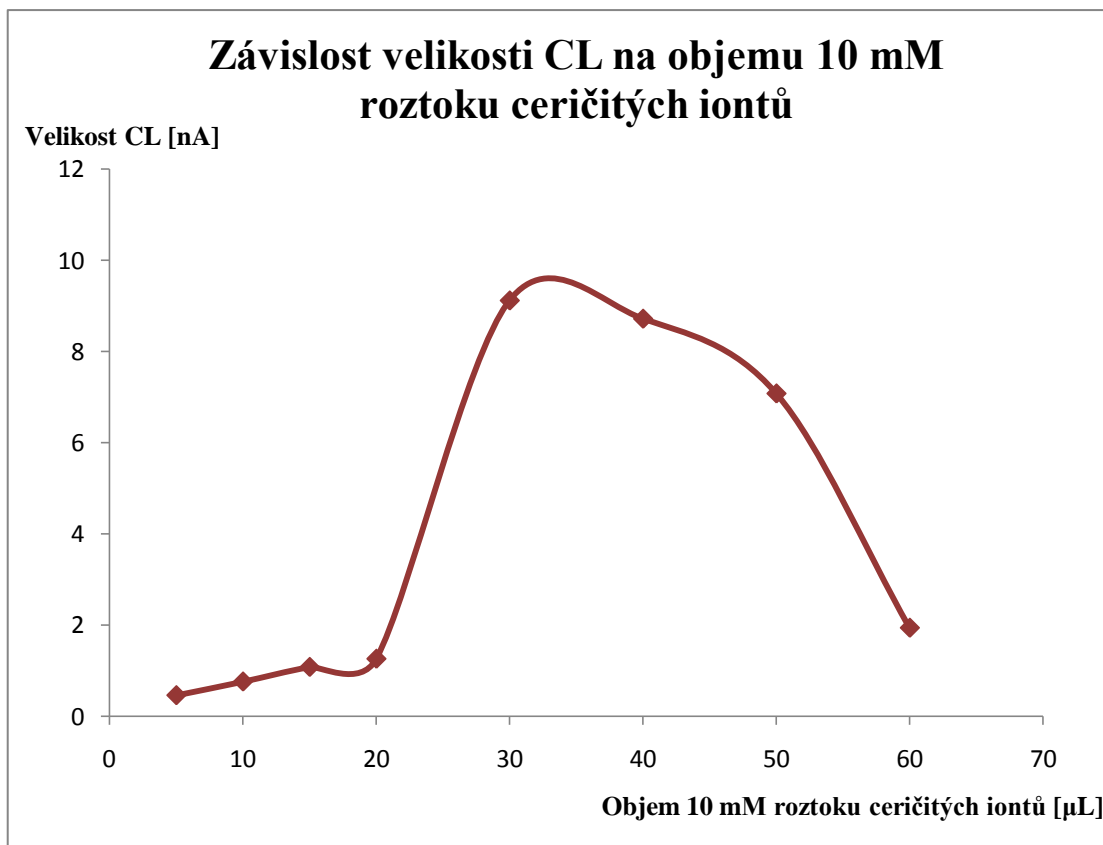
A) Objem 10 mM roztoku ceričitých iontů

Tabulka 13: Vliv objemu 10 mM roztoku ceričitých iontů.

Objem Ce(IV) [ $\mu\text{l}$ ]	Velikost signálu	Velikost slepého signálu	Po odečtení slepého signálu	CL [nA]
5	0,2205	0,2182	0,0023	0,46
10	0,3979	0,3941	0,0038	0,76
15	0,5068	0,5014	0,0054	1,08
20	0,6095	0,6032	0,0063	1,26
<b>30</b>	0,6771	0,6315	<b>0,0456</b>	<b>9,12</b>
40	0,6750	0,6314	0,0436	8,72
50	0,6669	0,6315	0,0354	7,08
60	0,6102	0,6005	0,0097	1,94

Citlivost detektoru 0,5  $\mu\text{A}$ .

Největší chemiluminiscenční signál vykazoval 1 mM roztok metforminu při měření s 30  $\mu\text{l}$  10 mM roztokem Ce(IV) iontů.



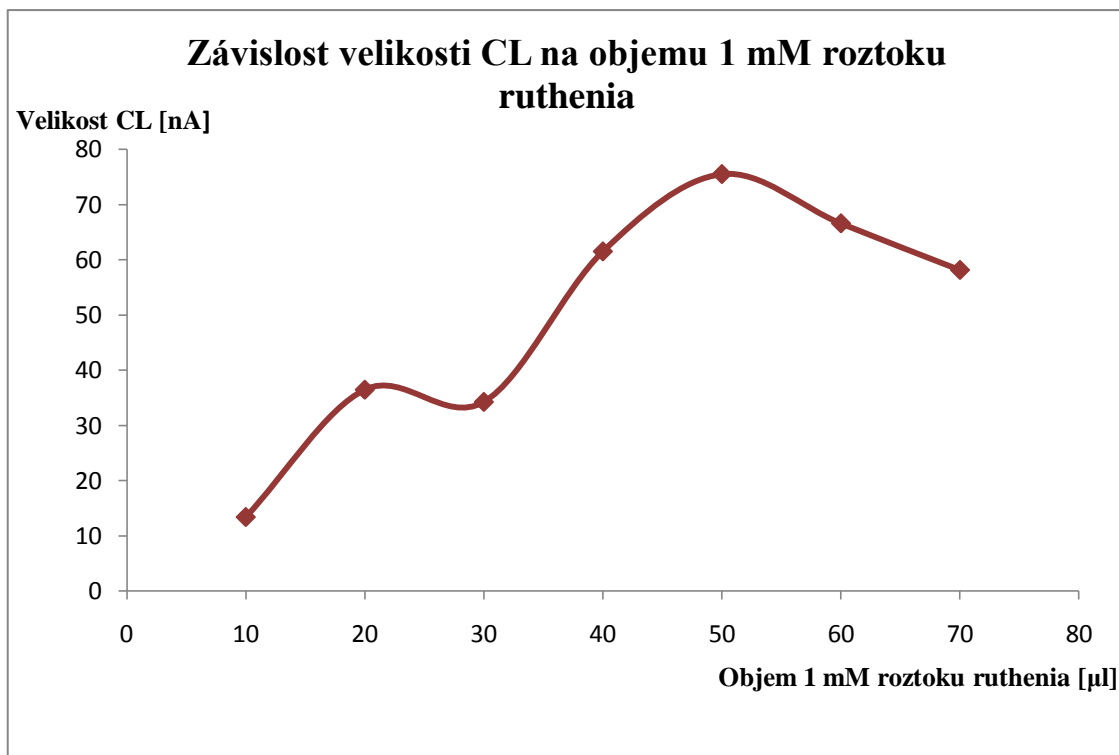
Obrázek 10: Závislost velikosti CL na objemu 10 mM roztoku ceričitých iontů.

#### B) Objem 1 mM roztoku ruthenia

Tabulka 14: Vliv objemu 1 mM roztoku ruthenia.

Objem Ru [μl]	Velikost signálu	Velikost slepého signálu	Po odečtení slepého signálu	CL [nA]
10	0,3039 <sup>A</sup>	0,1361	0,1678	13,42
20	0,9552 <sup>A</sup>	0,4103	0,4559	36,47
30	0,6206 <sup>B</sup>	0,4493	0,1713	34,26
40	0,7568 <sup>B</sup>	0,4492	0,3076	61,52
<b>50</b>	0,8269 <sup>B</sup>	0,4493	<b>0,3776</b>	<b>75,52</b>
60	0,7823 <sup>B</sup>	0,4493	0,3330	66,60
70	0,7401 <sup>B</sup>	0,4493	0,2908	58,16

<sup>A</sup> - citlivost detektoru 0,5 μA.    <sup>B</sup> - citlivost detektoru 0,5 μA.



Obrázek 11: Závislost velikosti CL na objemu 1 mM roztoku ruthenia.

Nejvyšší chemiluminiscenční signál vykazoval 1 mM roztok metforminu s 50 μl 1 mM roztoku ruthenia.

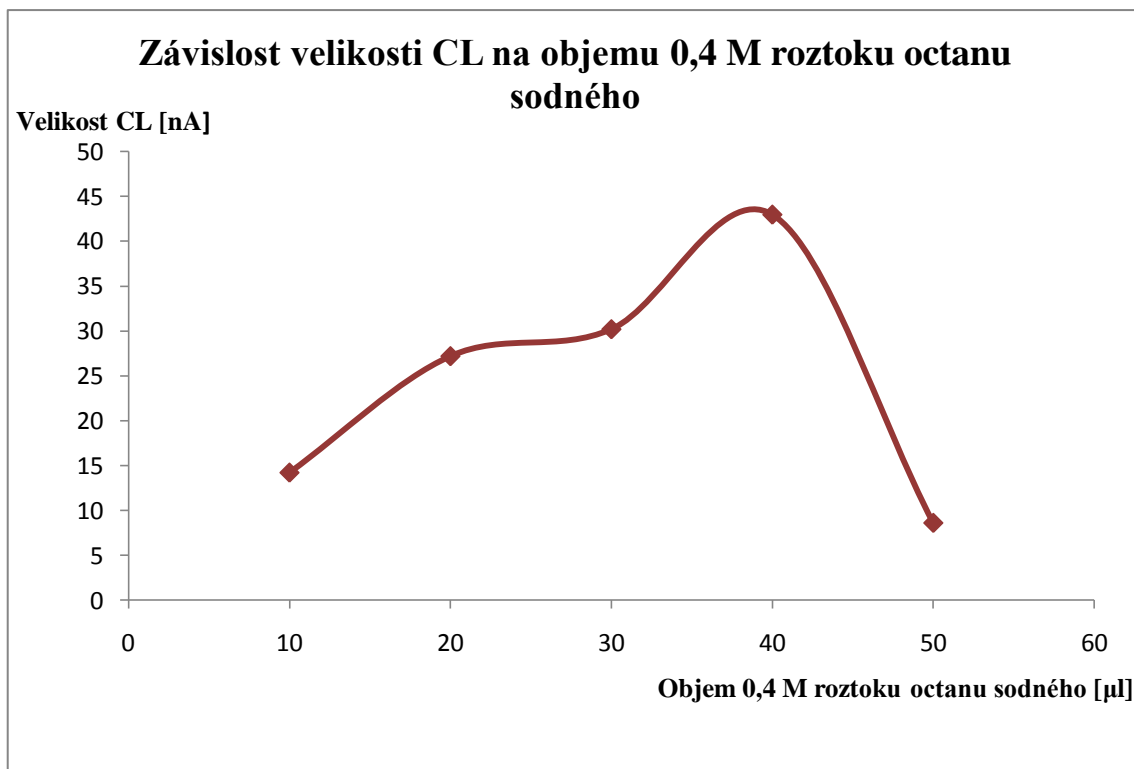
C) Objem 0,4 M roztoku octanu sodného

Tabulka 15: Vliv objemu 0,4 M roztoku octanu sodného.

Objem octanu sodného [μl]	Velikost signálu	Velikost slepého signálu	Velikost signálu	CL [nA]
10	0,5908 <sup>A</sup>	0,5196	0,0712	14,24
20	0,5612 <sup>B</sup>	0,4932	0,0680	27,20
30	0,7746 <sup>B</sup>	0,6991	0,0755	30,20
<b>40</b>	<b>0,8065<sup>B</sup></b>	<b>0,6991</b>	<b>0,1074</b>	<b>42,96</b>
50	0,7207 <sup>B</sup>	0,6991	0,0216	8,64

<sup>A</sup> - napětí 330 V, citlivost detektoru 0,5 μA.

<sup>B</sup> - napětí 300 V, citlivost detektoru 1 μA.



Obrázek 12: Závislost velikosti CL na objemu 0,4 M roztoku octanu sodného.

Největší chemiluminiscenční signál vykazoval 1 mM roztok metforminu s 40 μl 0,4 mM roztokem octanu sodného.

Výsledný ovládací program byl následující:

- 30 μl 10 mM roztoku ceričitých iontů
- 50 μl 1 mM roztoku ruthenia
- 15 μl 1 mM roztoku metforminu
- 40 μl 0,4 M roztoku octanu sodného
- rychlost do detektoru 50 μl/s
- 330 V, citlivost detektoru 0,5 μA

Po tomto měření byl připraven nový roztok octanu sodného (rozdíl koncentrací – původní 0,4004 mol/l, nový 0,3975 mol/l). Bohužel se nepodařilo dosáhnout srovnatelných výsledků, jako v předchozím měření.

Proto byly připraveny všechny roztoky nové a provedeno opakování předchozího měření. Avšak získaný signál ve formě píků začal být rozdvojený – pravděpodobně se ruthenium začalo usazovat v hadičkách průtokového systému, což způsobovalo snížení signálu.

Bylo vyzkoušeno promytí hadiček 96 % ethanolem a 1 M kyselinou sírovou.

Při dalším měření se výsledky stále měnily, nebyly opakovatelné. Proto bylo testování tohoto systému opuštěno.

### 8.1.3 Výsledky optimalizace u systému metforminu s N-bromsukcinimidem a fluoresceinem

#### 8.1.3.1 Schéma cyklu

A) Schéma 1:

- 100  $\mu\text{l}$   $1 \cdot 10^{-3}$  g/ml roztoku metforminu
- 50  $\mu\text{l}$  0,01 M roztoku NBS
- 50  $\mu\text{l}$  5 mM roztoku fluoresceinu
- 50  $\mu\text{l}$  2,5 mM roztoku CTAB
- rychlost transportu do detektoru 80  $\mu\text{l/s}$
- citlivost detektoru 0,02  $\mu\text{A}$ , napětí 420 V

Při těchto podmínkách byl signál vzorku o 0,8742 menší než signál slepého vzorku. Proto při stejném pořadí činidel byla vyzkoušena jiná průtoková rychlost pro transport do detektoru.

Tabulka 16: Změna průtokové rychlosti u schématu 1.

Průtoková rychlost [ $\mu\text{l/s}$ ]	Velikost signálu	Velikost slepého signálu	Výška signálu po odečtení slepého vzorku	CL[nA]
110	0,6831	1,6386	-0,9555	-7,64
100	0,7148	1,6473	-0,9325	-7,46
90	0,7272	1,5356	-0,8084	-6,47
80	0,7098	1,5249	-0,8151	-6,53
70	0,6864	1,4873	-0,8009	-6,41
60	0,4701	2 píky	2 píky	nezměřeno
50	0,3939	2 píky	2 píky	nezměřeno

Citlivost detektoru 0,02  $\mu\text{A}$ .

Protože slepý signál byl větší než signál vzorku, byly vyzkoušeny další možnosti.

B) Schéma 1a s promísením:

- 100  $\mu\text{l}$   $1 \cdot 10^{-3}$  g/ml roztoku metforminu
- 50  $\mu\text{l}$  0,01 M roztoku NBS
- 50  $\mu\text{l}$  5 mM roztoku fluoresceinu
- 50  $\mu\text{l}$  2,5 mM roztoku CTAB
- nasátí 60  $\mu\text{l}$  vody
- promísení, transport do detektoru
- rychlost transportu do detektoru 80  $\mu\text{l/s}$
- citlivost detektoru 0,02  $\mu\text{A}$ , napětí 420 V

Došlo ke zmenšení obou signálů (slepého i signálu vzorku), ale signál slepého vzorku byl pořád vyšší než signál vzorku metforminu.

C) Schéma 2 :

- 50  $\mu\text{l}$  0,01 M roztoku NBS
- 50  $\mu\text{l}$  5 mM roztoku fluoresceinu
- 50  $\mu\text{l}$  2,5 mM roztoku CTAB
- 100  $\mu\text{l}$   $1 \cdot 10^{-3}$  g/ml roztoku metforminu
- rychlost transportu do detektoru 80  $\mu\text{l/s}$
- citlivost detektoru 0,02  $\mu\text{A}$ , napětí 420 V

Chemiluminiscenční signál metforminu byl o 0,4313 vyšší než slepý signál. Byly testovány různé průtokové rychlosti.

Tabulka 17: Změna průtokové rychlosti u schématu 2.

Průtoková rychlost [ $\mu\text{l/s}$ ]	Velikost signálu	Velikost slepého signálu	Výška signálu po odečtení slepého vzorku	CL[nA]
<b>110</b>	<b>0,4900</b>	<b>0,3033</b>	<b>0,1867</b>	<b>37,34</b>
100	0,5019	0,3440	0,1579	31,58
90	0,4681	0,3138	0,1543	30,86
80	0,4569	0,3321	0,1248	24,96
70	0,4159	0,2823	0,1336	26,72
50	0,4010	0,2413	0,1597	31,94

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

Protože koncentrace roztoku fluoresceinu byla poměrně vysoká, byl 10x naředěn na výslednou koncentraci 0,5 mM a hadičky byly propláchnuty 96% ethanolem.

- 50  $\mu$ l 0,01 M roztoku NBS
- 50  $\mu$ l 0,5 mM roztoku fluoresceinu
- 50  $\mu$ l 2,5 mM roztoku CTAB
- 100  $\mu$ l  $1 \cdot 10^{-3}$  g/ml roztoku metforminu
- rychlost transportu do detektoru 80  $\mu$ l/s
- citlivost detektoru 0,5  $\mu$ A, napětí 420 V

Výška signálu se zvětšila (0,6027), slepý signál se snížil.

Byla vyzkoušena i 100x nižší koncentrace roztoku fluoresceinu – 0,05 mM.

- 50  $\mu$ l 0,01 M roztoku NBS
- 50  $\mu$ l 0,05 mM roztoku fluoresceinu
- 50  $\mu$ l 2,5 mM roztoku CTAB
- 100  $\mu$ l  $1 \cdot 10^{-3}$  g/ml roztoku metforminu
- rychlost transportu do detektoru 80  $\mu$ l/s
- citlivost detektoru 1,0  $\mu$ A, napětí 420 V

Výška signálu se zvětšila (0,7557), slepý signál se snížil. Při 1000x ředění už signál nebyl měřitelný.

Naměřené výsledky byly uspokojivé, proto bylo testováno, zda bude možné změřit stejné koncentrace metforminu, jaké byly uvedené v původním článku [1].

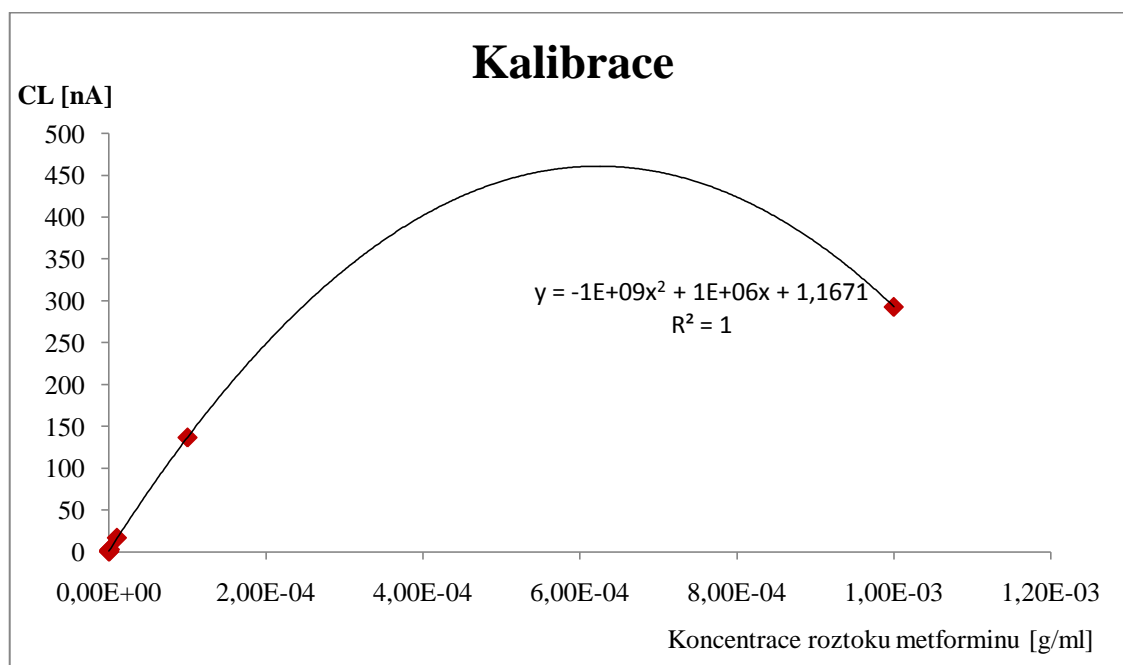


Tabulka 18: Pracovní kalibrace.

Koncentrace roztoku metforminu [g/ml]	Výška signálu	Výška slepého signálu	Výška signálu po odečtení slepého vzorku	CL [nA]
$10^{-3}$	0,7424 <sup>A</sup>	0,0102	0,7322	292,88
$10^{-4}$	0,3519 <sup>A</sup>	0,0101	0,3418	136,72
$10^{-5}$	0,5180 <sup>B</sup>	0,1000	0,4188	16,75
$10^{-6}$	0,3760 <sup>C</sup>	0,2351	0,1409	2,82
$10^{-7}$	0,5890 <sup>D</sup>	0,3521	0,2369	1,90
$10^{-8}$	0,4439 <sup>D</sup>	0,3513	0,0926	0,74
$10^{-9}$	0,3558 <sup>D</sup>	0,3533	0,0025	0,02

<sup>A</sup> – citlivost detektoru 1,0  $\mu\text{A}$ . <sup>B</sup> - citlivost detektoru 0,1  $\mu\text{A}$ .

<sup>C</sup> - citlivost detektoru 0,05  $\mu\text{A}$ . <sup>D</sup> - citlivost detektoru 0,02  $\mu\text{A}$ .



Obrázek 13: Pracovní kalibrace.

Změřené hodnoty nebyly příliš vysoké, pravděpodobně nebylo úplně optimální schéma měřicího cyklu. Proto byla provedena detailní optimalizace, tentokrát s využitím programu FaFSIA-Optim metodou SIMPLEX, přičemž bylo zachováno pořadí činidel:

0,01 M roztok NBS, 0,05 mM roztok fluoresceinu, 2,5 mM roztok CTAB, roztok metforminu, napětí 400 V, citlivost detektoru 1,0  $\mu$ A.

Jednotlivé parametry byly testovány v následujících rozmezech:

- objem NBS                                    10 – 100  $\mu$ l                                    úvodní hodnota 40  $\mu$ l
- objem fluoresceinu                        10 – 100  $\mu$ l                                    úvodní hodnota 40  $\mu$ l
- objem CTAB                                    10 – 100  $\mu$ l                                    úvodní hodnota 40  $\mu$ l
- průtoková rychlost                        50 – 150  $\mu$ l/s                                    úvodní hodnota 100  $\mu$ l/s

Tabulka 19: Hodnoty získané automatickou optimalizací.

Číslo měření	NBS [ $\mu$ l]	fluorescein [ $\mu$ l]	CTAB [ $\mu$ l]	Rychlost [ $\mu$ l/s]	Výška signálu	SD [%]	CL [nA]
1	65	43	62	82	2,0151	6,43	806,04
2	55	43	62	82	1,6279	2,04	651,16
3	60	34	62	82	2,1012	1,54	840,48
4	60	40	54	82	1,9733	1,29	789,32
5	60	40	60	74	1,8707	2,64	748,28
6	68	36	57	78	2,1708	0,63	868,32
<b>7</b>	<b>66</b>	<b>36</b>	<b>58</b>	<b>88</b>	<b>2,2082</b>	<b>0,09</b>	<b>883,28</b>
8	70	34	66	83	2,1622	0,60	864,88
9	67	27	60	84	1,6305	1,38	652,20
10	65	43	62	82	2,0796	1,88	831,84
11	67	27	60	84	1,5877	2,36	635,08
12	65	43	62	82	2,0498	0,32	819,92
13	67	27	60	84	1,7229	7,99	689,16
14	65	43	62	82	2,0519	1,01	820,76
15	67	27	60	84	1,6659	2,83	666,36
16	65	43	62	82	2,0540	2,14	821,60
17	67	27	60	84	1,6916	2,73	676,64
18	65	43	62	82	2,0464	0,44	818,56

Citlivost detektoru 1,0  $\mu$ A.

Díky programu FaFSIA Optim byly získány hodnoty objemů a průtokové rychlosti, které se používaly ve zbývajících měřeních:

- 66  $\mu\text{l}$  0,01 M roztoku NBS
- 36  $\mu\text{l}$  0,05 mM roztoku fluoresceinu
- 58  $\mu\text{l}$  2,5 mM roztoku CTAB
- 100  $\mu\text{l}$   $1 \cdot 10^{-3}$  g/ml roztoku metforminu
- rychlost aspirace roztoků 100  $\mu\text{l/s}$
- rychlost transportu do detektoru 88  $\mu\text{l/s}$
- citlivost detektoru 1,0  $\mu\text{A}$ , napětí 400 V

Výsledný program tedy byl:

Syringe pump	valve position IN	
Syringe pump	set flow rate [ $\mu\text{l/s}$ ]	100
Syringe pump	aspirate [ $\mu\text{l}$ ]	200
Syringe pump	valve position OUT	
Syringe pump	set flow rate [ $\mu\text{l/s}$ ]	100
multi-port valve	set valve position	3 {NBS}
Syringe pump	aspirate [ $\mu\text{l}$ ]	66
multi-port valve	set valve position	4 {fluorescein}
Syringe pump	aspirate [ $\mu\text{l}$ ]	36
multi-port valve	set valve position	5 {CTAB}
Syringe pump	aspirate [ $\mu\text{l}$ ]	58
multi-port valve	set valve position	2 {metformin}
Syringe pump	aspirate [ $\mu\text{l}$ ]	100
multi-port valve	set valve position	8 {detektor}
Syringe pump	set flow rate [ $\mu\text{l/s}$ ]	88
Syringe pump	empty syringe	
Syringe pump	valve position IN	
Syringe pump	aspirate [ $\mu\text{l}$ ]	300
Syringe pump	valve position OUT	
multi-port valve	set valve position	9 {96% ethanol}
Syringe pump	aspirate [ $\mu\text{l}$ ]	90
multi-port valve	set valve position	8

Syringe pump      empty syringe

\*Number of cycles #3

Citlivost detektoru se měnila v závislosti na koncentraci roztoku metforminu od 0,05 - 1,0  $\mu\text{A}$ , napětí 400 V.

## 8.2 Kalibrační závislosti u systému metforminu s N-bromsukcinimidem a fluoresceinem

Při měření kalibrační závislosti byly používány roztoky metforminu v jednotkách koncentrace mol/l.

Tabulka 20: Kalibrační závislost roztoku metforminu.

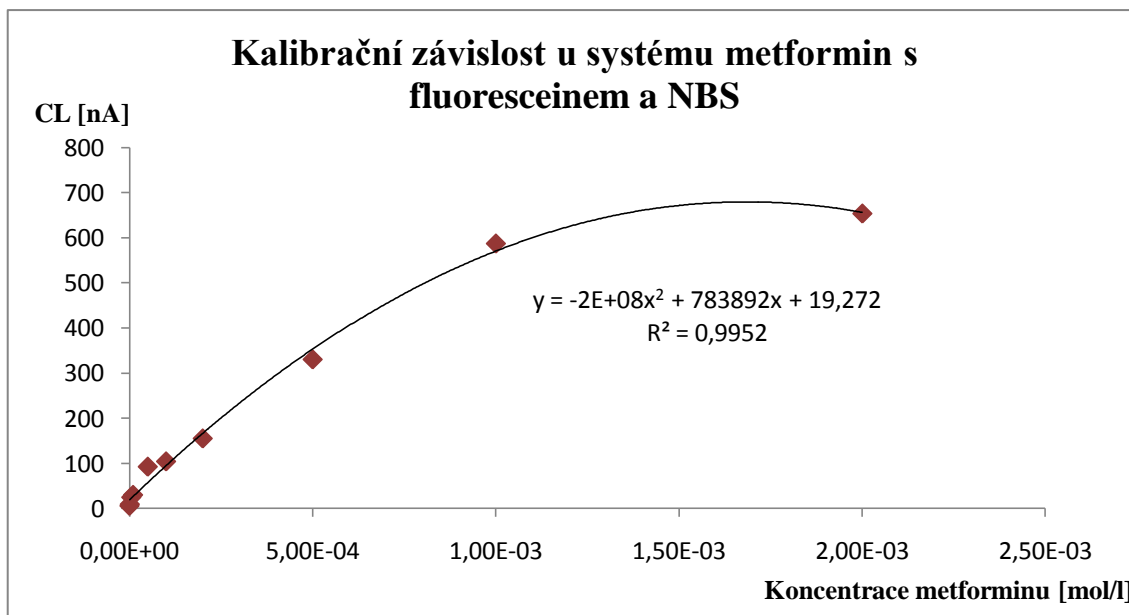
Koncentrace roztoku metforminu [M]	výška signálu	hodnota CL [nA]
$10^{-7}$	0,2638 <sup>A</sup>	5,28
$10^{-6}$	0,4439 <sup>A</sup>	8,88
$5 \times 10^{-6}$	0,6075 <sup>B</sup>	24,30
$10^{-5}$	0,7380 <sup>B</sup>	29,52
$5 \times 10^{-5}$	0,4607 <sup>C</sup>	92,14
$10^{-4}$	0,7737 <sup>C</sup>	103,84
$2 \times 10^{-4}$	0,5192 <sup>C</sup>	154,74
$5 \times 10^{-4}$	0,8251 <sup>D</sup>	330,04
$10^{-3}$	1,4676 <sup>D</sup>	587,04
$2 \times 10^{-3}$	1,6340 <sup>D</sup>	653,60
$5 \times 10^{-3}$	2,0115 <sup>D</sup>	804,60
$10^{-2}$	1,6589 <sup>D</sup>	663,56

<sup>A</sup> - citlivost detektoru 0,05  $\mu\text{A}$

<sup>B</sup> - citlivost detektoru 0,1  $\mu\text{A}$

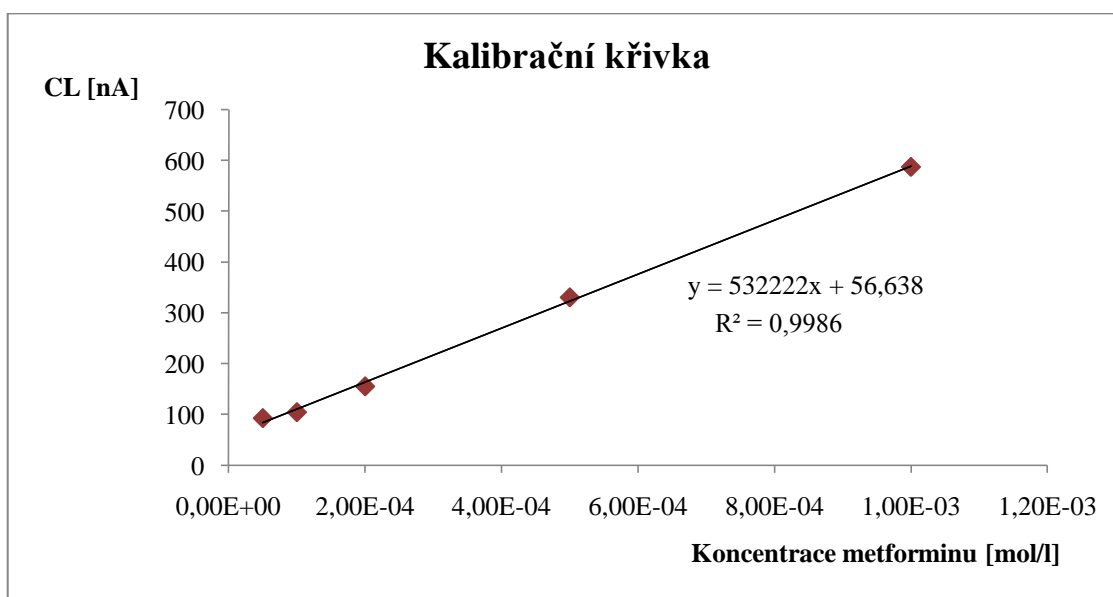
<sup>C</sup> - citlivost detektoru 0,5  $\mu\text{A}$

<sup>D</sup> - citlivost detektoru 1,0  $\mu\text{A}$



Obrázek 14:Kalibrační závislost systému metforminu s fluoresceinem a NBS.

Kalibrační závislost (v rozmezí  $10^{-7} - 2 \times 10^{-3}$  M) u tohoto systému měla polynomický tvar s rovnicí křivky  $y = -2E+08x^2 + 783892x + 19,272$ , hodnota korelačního koeficientu byla  $R^2 = 0,9952$ . Kalibrace probíhala při citlivosti detektoru od  $0,05 \mu\text{A}$  do  $1,0 \mu\text{A}$  za napětí na fotonásobiči 400V.



Obrázek 15:Lineární úsek kalibrační křivky metforminu s fluoresceinem a NBS.

Z původní křivky byla vybrána jen určitá oblast (rozmezí  $1 \times 10^{-3} - 5 \times 10^{-5}$ ), ve které byla nalezena lineární závislost chemiluminiscenčního signálu na koncentraci metforminu. Rovnice přímky je  $y = 532222x + 56,638$  s hodnotou korelačního koeficientu  $R^2 = 0,9986$ .

Hodnota detekčního limitu se rovná 4,76 nA, velikost kvantifikačního limitu je 5,60 nA.

Hodnota detekčního limitu byla vypočtena z velikosti slepého signálu a velikosti šumu: velikost slepého signálu byla změřena při 400 V a citlivosti detektoru 0,01  $\mu$ A na 1,10; to odpovídá velikosti chemiluminiscence 4,40 nA. Při stejných podmínkách byl změřen šum na 0,03, což je 0,12 nA.

Detekční limit je součtem 3 násobku šumu + slepý signál,

tedy  $(0,12 \times 3) + 4,40 = 4,76 \text{ nA} \sim 5 \times 10^{-8} \text{ M}$ .

Kvantifikační limit je součtem 10-ti násobku šumu + slepý signál,

tedy  $(0,12 \times 10) + 4,40 = 5,60 \text{ nA} \sim 2 \times 10^{-7} \text{ M}$ .

### 8.3 Opakovatelnost u systému metforminu s N-bromsukcinimidem a fluoresceinem

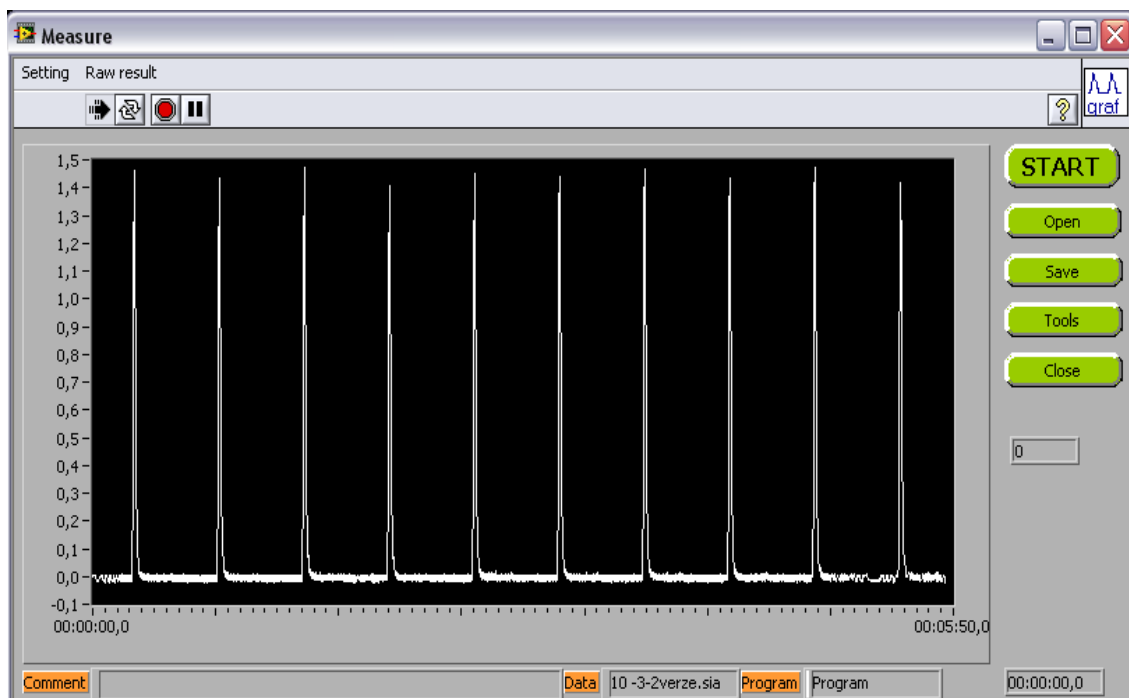
Opakovatelnost byla proměřena u roztoku metforminu o koncentraci  $10^{-4}$  M a  $10^{-3}$  M.

Tabulka 21: Opakovatelnost.

Číslo měření/c [M]	$10^{-3}$	$10^{-4}$
1	1,4144	0,5089
2	1,4002	0,5266
3	1,4394	0,5118
4	1,3745	0,5198
5	1,4189	0,5162
6	1,4044	0,5042
7	1,4359	0,5066
8	1,3969	0,4928
9	1,4349	0,4964
10	1,3829	0,5200
<b>průměr</b>	<b>1,41024</b>	<b>0,51033</b>
<b>SD</b>	<b>0,02248</b>	<b>0,01075</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>1,59</b>	<b>2,11</b>

Opakovatelnost u roztoku metforminu o koncentraci  $10^{-3}$  M byla 1,59 %; u roztoku o koncentraci  $10^{-4}$  M roztoku 2,11 %.





Obrázek 16: Opakovatelnost  $10^{-3}$  M roztok metforminu.

## 8.4 Souhrn

Chemiluminiscenční vlastnosti metforminu byly studovány pomocí SIA ve třech různých systémech.

- 1) Systém s  $\text{KMnO}_4$  a  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , kde byly optimalizovány objem a koncentrace těchto činidel a metforminu, schéma měřicího cyklu a průtoková rychlost. Bohužel získané signály byly příliš nízké, slepý signál vysoký, a protože ani změnou koncentrace činidel ani propláchnutím hadiček se nepodařilo získat lepší výsledky, bylo testování tohoto systému opuštěno.
- 2) Systém se síranem ceričitým a (tris(2,2'-bipyridyl)dichloro-ruthenium hexahdrátem. U uvedeného systému byly také optimalizovány objemy a koncentrace činidel, průtoková rychlost, schéma měřicího cyklu a použitá rozpouštědla. Po optimalizaci jednotlivých parametrů se jako nejlepší schéma jevílo následující:
  - 30  $\mu\text{l}$  10 mM roztoku ceričitých iontů
  - 50  $\mu\text{l}$  1 mM roztoku ruthenia
  - 15  $\mu\text{l}$  1 mM roztoku metforminu
  - 40  $\mu\text{l}$  0,4 M roztoku octanu sodného
  - rychlost transportu do detektoru 50  $\mu\text{l/s}$
  - 330 V, citlivost detektoru 0,5  $\mu\text{A}$

Po přípravě nového roztoku octanu sodného (rozdíl koncentrací – původní 0,4004 mol/l, nový 0,3975 mol/l), se nepodařilo dosáhnout srovnatelných výsledků, jako v předchozím měření. Proto byly připraveny všechny roztoky nové a provedeno opakování předchozího měření. Avšak získaný signál ve formě píků začal být rozdvojený – pravděpodobně se ruthenium začalo usazovat v hadičkách průtokového systému, což způsobovalo snížení signálu.

Bylo vyzkoušeno promytí hadiček průtokového systému 96 % ethanolem a 1 M kyselinou sírovou. Při dalším měření se výsledky stále měnily, nebyly opakovatelné. Proto bylo testování tohoto systému opuštěno.

- 3) Systém s NBS a fluoresceinem se jevil jako jediný prakticky použitelný. Koncentrace N-bromsukcinimidu a fluoresceinu vycházely z údajů vyhledaných

v odborné literatuře [1]. Ostatní parametry (objem, rychlost) byly optimalizovány automaticky s využitím programu FaFSIA-Optim, vytvořeným na Katedře analytické chemie. Výsledné schéma vypadalo následovně:

- 36  $\mu\text{l}$  0,05 mM roztoku fluoresceinu
- 58  $\mu\text{l}$  2,5 mM roztoku CTAB
- 100  $\mu\text{l}$   $1 \cdot 10^{-3}$  g/ml roztoku metforminu
- rychlost aspirace roztoků 100  $\mu\text{l/s}$
- rychlost transportu do detektoru 88  $\mu\text{l/s}$
- citlivost detektoru 1,0  $\mu\text{A}$ , napětí 400 V

Kalibrační závislost (v rozmezí  $10^{-7}$  –  $2 \cdot 10^{-3}$  M) u tohoto systému měla polynomičtý tvar s rovnicí křivky  $y = -2\text{E}+08x^2 + 783892x + 19,272$ , hodnota korelačního koeficientu byla  $R^2 = 0,9952$ . Z původní křivky byla vybrána jen určitá oblast (rozmezí  $1 \cdot 10^{-3}$  –  $5 \cdot 10^{-5}$ ), ve které byla nalezena lineární závislost chemiluminiscenčního signálu na koncentraci metforminu. Rovnice přímky je  $y = 532222x + 56,638$  s hodnotou korelačního koeficientu  $R^2 = 0,9986$ .

Hodnota detekčního limitu 4,76 nA  $\sim 5 \cdot 10^{-8}$  M.

Kvantifikační limit je 5,60 nA  $\sim 2 \cdot 10^{-7}$  M.

Opakovatelnost u roztoku metforminu o koncentraci  $10^{-3}$  M byla 1,59 %; u roztoku o koncentraci  $10^{-4}$  M roztoku 2,11 %.

## 9 Závěr

Nejlepší a jediný systém, u kterého bylo provedeno proměření kalibrace a opakovatelnosti, byl systém s NBS a fluoresceinem. Částečně se vycházelo z literatury [1], částečně se parametry byly podmínky reakce optimalizovány. Výsledkem byl systém s následujícím měřícím cyklem:

- 36  $\mu\text{l}$  0,05 mM roztoku fluoresceinu
- 58  $\mu\text{l}$  2,5 mM roztoku CTAB
- 100  $\mu\text{l}$   $1 \cdot 10^{-3}$  g/ml roztoku metforminu
- rychlost aspirace roztoků 100  $\mu\text{l/s}$
- rychlost transportu do detektoru 88  $\mu\text{l/s}$
- citlivost detektoru 1,0  $\mu\text{A}$ , napětí 400 V

Kalibrační závislost (v rozmezí  $10^{-7}$  –  $2 \times 10^{-3}$  M) byla polynomického tvaru. Lineární oblast se nacházela v rozmezí  $1 \times 10^{-3}$  –  $5 \times 10^{-5}$ .

Hodnota detekčního limitu byla 4,76 nA  $\sim 5 \times 10^{-8}$  M (8,28 ng/ml). Kvantifikační limit měl hodnotu 5,60 nA  $\sim 2 \times 10^{-7}$  M (33,12 ng/ml).

Opakovatelnost u roztoku metforminu o koncentraci  $10^{-3}$  M byla 1,59 %; u roztoku o koncentraci  $10^{-4}$  M roztoku 2,11 %.

Tento systém byl nejlepším ze všech třech testovaných chemiluminiscenčních systémů. Hodnoty detekčního a kvantifikačního limitu jsou o několik jednotek vyšší než hodnoty v článku týkajícím se chemiluminiscenčního stanovení, ze kterého se v práci vycházelo [1]. Ve srovnání s ostatními detekčními metodami uvedenými na str.17 má však tento systém nižší hodnotu detekčního i kvantifikačního limitu, někde i o 3 řády, poměrně široký kalibrační rozsah a rychlost analýzy je 36 s, takže při třech paralelních měřeních jednoho vzorku je možno změřit 33 vzorků za hodinu.

## 10 Použitá literatura

1. Wang Z., Zhang Z., Fu Z., Luo W., Zhang X., Sensitive flow-injection chemiluminescence determination of metformin based on N-bromosuccinimide-fluorescein system, *Anal. Lett.* 36 (2003) 2683-2697.
2. Český lékopis 2009, 2. díl, 2578-2579, Grada Publishing a.s., Praha 2009.
3. Remedia kompendium, 4. vydání, 472, Panax Co, spol s.r.o., Praha 2009.
4. Yardimci C., Özaltın N., Method development and validation for the simultaneous determination of rosiglitazone and metformin in pharmaceutical preparations by capillary zone electrophoresis, *Anal. Chim. Acta* 549 (2005) 88-95.
5. Yardimci C., Özaltın N., Gürlek A., Simultaneous determination of rosiglitazone and metformin in plasma by gradient liquid chromatography with UV detection, *Talanta* 72 (2007) 1416-1422.
6. Hassan S.S.M., Mahmoud W.H., Elmosallamy M.A.F., Othman A.H.M., Determination of metformin in pharmaceutical preparations using potentiometry, spectrofluorimetry and UV-visible spectrophotometry, *Anal. Chim. Acta* 78 (1999) 299-311.
7. Pimenta A.M., Montenegro M.C.B.S.M., Araújo A.N., Calatayud J.M., Application of sequential injection analysis to pharmaceutical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 16-34.
8. Růžička, J.: Flow injection, 4th Edition, FIALab Instruments Inc., 2009.
9. Solich P., Polášek M., Klimundová J., Růžička J., Sequential injection technique applied to pharmaceutical analysis, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 116-126.
10. Mervartová K., Polášek M., Calatayud J.M., Recent applications of flow-injection and sequential-injection analysis techniques to chemiluminescence determination of pharmaceuticals, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45 (2007) 367-381.
11. Adcock J.L, Francis P.S., Barnett N.W., Acidic potassium permanganate as a chemiluminescence reagent-A review, *Anal. Chim. Acta* 601 (2007) 36-67.
12. Horáková M., Diplomová práce, Faf UK Hradec Králové, 2010.
13. Mervartová K., Polášek M., Calatayud J.M., Sequential injection analysis (SIA)-chemiluminescence determination of indometacin using tris[(2,2'-

bipyridyl]ruthenium(III) as reagent and its application to semisolid pharmaceutical dosage forms, *Anal. Chim. Acta* 600 (2007) 114-121.