

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie

EXTRAKCE NA TUHOU FÁZI METODOU
LAB-ON-VALVE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

Hradec Králové, 2011

Lukáš Koblasa

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

Rád bych poděkoval PharmDr. Petru Chocholoušovi, Ph.D. za jeho vedení, nápady a rady, bez kterého by tato diplomová práce nespátřila světlo světa.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie

Kandidát: Lukáš Koblasa

Školitel: PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

Název diplomové práce: Extrakce na tuhou fázi metodou Lab-On-Valve

Diplomová práce se zabývá vývojem metody pro přímé stanovení kalium šetřícího diuretika amiloridu ze vzorku moči metodou bead injection (BI) využívajícím systém Lab-on-Valve (LOV). Stanovení bylo založeno na selektivním zachycením amiloridu na kuličkách sorbentu (Sephadex-CM C-25 Ion-exchange), zatímco možné interferující komponenty moči byly vypláchnuty nosným proudem do odpadu. Po zakoncentrování byl amilorid z kuliček eluován roztokem elučního činidla (0,25 M HNO₃ + 0,05 M KCl) o rychlosti průtoku 5 µl/s. Detekován byl pomocí fluorescenčního spektrometru při vlnové délce 272 nm. Amilorid byl naspikován do desetkrát zředěné moči, k jedné analýze ho bylo zapotřebí 300 µl. Linearita odezvy se pohybovala v rozmezí koncentrací 0,2 – 10,00 µg/ml ($r = 0,990$). Limit detekce (LOD) odpovídal koncentraci 0,05 µg/ml. Celá analýza trvala 280 sekund.

Abstract

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Analytical chemistry

Candidate: Lukáš Koblasa

Supervisor: PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

Title of diploma thesis: Solid phase extraction by method Lab-On-Valve

This thesis deals with the development of method for direct determination of potassium-saving diuretic amiloride in the urine sample by bead injection (BI) using Lab-on-Valve system (LOV). The determination was based on the selective capture of the amiloride on beads with sorbent (CM-Sephadex C-25 ion-exchange), while the possible interfering urine components were flushed into the waste stream of carrier. After preconcentration amiloride was eluted from the beads by eluent solution (0.25 M HNO₃ + 0.05 M KCl), with flow rate of 5 µl/s. Detection was carried out a fluorescence spectrometer at a wavelength of 272 nm. Urine was diluted ten times and spiked by amiloride. For one analysis it was necessary to take 300 µl of the sample. Linearity of response was in the range of concentrations from 0.2 to 10.00 µg/ml ($r = 0.990$). The limit of detection (LOD) corresponds to a concentration of 0.05 mg / ml. The whole analysis lasted 280 seconds.

OBSAH

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
OBSAH.....	6
Seznam obrázků.....	8
Seznam tabulek.....	9
Seznam zkratk.....	10
1. ÚVOD.....	11
2. CÍL PRÁCE.....	12
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	13
3.1. Amilorid hydrochloridum dihydricum.....	14
3.2. Extrakce na tuhou fázi.....	16
3.2.1. Vývoj a princip SPE.....	16
3.2.2. Sorbenty.....	17
3.2.3. Instrumentace.....	17
3.3. Průtokové metody.....	18
3.3.1. Průtoková injekční analýza (FIA).....	18
3.3.2. Sekvenční injekční analýza (SIA).....	19
3.3.3. Porovnání FIA a SIA.....	20
3.4. Lab-on-valve.....	22
3.4.1. Vývoj a princip LOV.....	22
3.4.2. Detekční módy v SI-LOV.....	23
Metoda kontinuálního proudu.....	24
Metoda stopped-flow.....	24
3.4.3. Fluorescenční spektrometrie v systému LOV.....	25
3.5. Bead Injection.....	26
3.5.1. Princip detekce v BI.....	26
3.5.2. Kuličky (Beads).....	27
3.5.3. BI ve formátu LOV.....	29
3.5.4. Konfigurace průtokové cely.....	30
3.6. Metody stanovení amiloridu.....	31
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	32

4.1. Použité přístroje, chemikálie a příprava vzorků	33
4.1.1. Přístrojové vybavení.....	33
4.1.2. Chemikálie	33
4.1.3. Příprava roztoků	33
Příprava elučního činidla 1 (0,075 M HNO ₃ + 0,05 M KCl).....	33
Příprava elučního činidla 2 (0,25 M HNO ₃ + 0,05 M KCl).....	34
Příprava zásobního roztoku standardu amiloridu	34
Příprava vzorku ve vodě	34
Příprava vzorku v moči.....	34
Příprava kuliček	34
4.2. Optimalizace metody	35
4.2.1. Optimalizace chování kuliček	35
4.2.2. Zapojení pro optimalizaci metody extrakce a stanovení amiloridu	36
4.2.3. Výběr vlnové délky detektoru.....	37
4.2.4. Optimalizace objemu a rychlosti nasátí a nástřiku vzorku.....	37
4.2.5. Optimalizace objemu a rychlosti nasátí a nástřiku elučního činidla	37
4.3. Program.....	39
4.4. Výběr elučního činidla.....	41
4.5. Kalibrační křivka roztoku amiloridu.....	42
4.6. Stanovení limitu detekce a kvantifikace	45
4.7. Opakovatelnost	46
4.8. Analýza v moči	47
4.8.1. Vliv ředění moči na odezvu detektoru	47
4.8.2. Testování opakovaného nástřiku vzorku na stejné kuličky.....	50
4.8.3. Změna pH elučního činidla	52
4.8.4. Kalibrační křivka amiloridu v moči	53
5. ZÁVĚR.....	55
Seznam použité literatury	57

Seznam obrázků

Obr. 1 – vzorec amiloridu	14
Obr. 2 – kolony a disky používané v klasickém SPE	16
Obr. 3 – princip FIA	18
Obr. 4 - základní schéma systému FIA	19
Obr. 5 – princip SIA	19
Obr. 6 – základní schéma systému SIA	20
Obr. 7 - schéma systému LOV	22
Obr. 8 - detail nástavce LOV	23
Obr. 9 – princip metody kontinuálního proudu	24
Obr. 10 - princip metody stopped -flow	25
Obr. 11 - schéma zapojení optických vláken pro fluorescenci v systému LOV	25
Obr. 12 - princip detekce v bead injection	27
Obr. 13 - detail sorbentů používaných u bead Injection	28
Obr. 14 – schéma zapojení pro bead injection v systému LOV	29
Obr. 15 – zapojení průtokové cely pro fluorescenční spektroskopii (a) a pro kombinaci UV-VIS a fluorescence (b) v bead injection	30
Obr. 16 - – zapojení průtokové cely pro mikrokolonovou chromatografií (a) a pro kombinaci mikrokolonové chromatografie s BIS (b)	30
Obr. 17 - zapojení nástavce LOV u testování chování kuliček	35
Obr. 18 - zapojení nástavce LOV pro optimalizaci metody extrakce a stanovení Am	Chyba! Záložka není definována. 36
Obr. 19 – kalibrační křivka pro amilorid v lineární části 0,25 - 10,00 µg/ml.....	43
Obr. 20 – polynomičká kalibrační křivka pro amilorid v rozmezí 0,25 – 30,00 µg/ml..	44
Obr. 21 – záznam stanovení limitu detekce amiloridu (c = 0,05 µg/ml)	45
Obr. 22 – testování vlivu ředění moči na odezvu – plná moč s Am.....	48
Obr. 23 - testování vlivu ředění moči na odezvu – moč zředěná vodou 1:1 s Am.....	48
Obr. 24 - testování vlivu ředění moči na odezvu – moč zředěná vodou 1:10 s Am.....	48
Obr. 25 – samotná moč zředěná 1:10 vodou	49
Obr. 26 – testování opakovaného nástřiku na stejné kuličky – jeden nástřik.....	51
Obr. 27 - testování opakovaného nástřiku na stejné kuličky – dva nástřiky	51
Obr. 28 - testování opakovaného nástřiku na stejné kuličky – tři nástřiky.....	51

Obr. 29 - závislost odezvy detektoru (mV) na koncentraci amiloridu ($\mu\text{g/ml}$)
v naspikované moči, koncentrace amiloridu 0,2 – 10,00 $\mu\text{g/ml}$ 53

Seznam tabulek

Tabulka 1 - program používaný při testování	39
Tabulka 2 – data pro kalibrační křivku roztoku amiloridu	42
Tabulka 3 – statistické parametry pro kalibrační křivku amiloridu.....	43
Tabulka 4 - statistické parametry pro polynomickou kalibrační křivku amiloridu;	44
Tabulka 5 – výsledky měření opakovatelnosti metody stanovení amiloridu.....	46
Tabulka 6 – popis přípravy vzorku pro zkoušení vlivu ředění moči na odezvu.....	49
Tabulka 7 – výsledky zkoušení vlivu ředění moči na odezvu	49
Tabulka 8 – výsledky zkoušení opakovaného nástřiku vzorku na stejné kuličky	50
Tabulka 9 – data pro kalibrační křivku roztoku amiloridu v moči	54
Tabulka 10 - statistické parametry pro kalibrační křivku amiloridu v moči	54
Tabulka 11 – plné výsledky měření pro kalibrační křivku amiloridu v moči.....	54

Seznam zkratk

AAS – atomová absorpční spektrometrie

Am – amilorid

BI – bead injection

FIA – průtoková injekční analýza (flow injection analysis)

FK – farmakokinetika

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)

LLE – extrakce kapalina-kapalina (liquid-liquid extraction)

LOV – Lab-on-valve

MPV – vícecestný ventil

MS – hmotnostní spektrometrie

MÚ – mechanismus účinku

NÚ – nežádoucí účinky

RSD – relativní směrodatná odchylka

SD – směrodatná odchylka

SIA – sekvenční injekční analýza (sequential injection analysis)

SI-LOV (syn. μ SI-LOV) – spojení sekvenční injekční analýzy s nástavcem LOV

SPE – extrakce na tuhou fázi (solid-phase extraction)

UV-VIS – spektrometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti

1. ÚVOD

Injekční analýza od svého prvního uvedení v roce 1974 uběhla už pěkný kus cesty, která vedla od průtokové injekční analýzy, přes analýzu sekvenční až ke zmenšené formě přístroje prezentované systémem Lab-on-valve.

Naše pracoviště se zabývá všemi druhy injekčních analýz téměř od prvopočátku a popsalo již nespočet metod použitelných v nejrůznějších aplikacích ve farmaceutické analýze.

My jsme se do klikatých cest vývinu injekční analýzy připlétli v době nástupu miniaturizace a tím i příchodu LOV. Systém LOV v sobě zahrnuje nejen všestrannost systému SIA a své skladné rozměry, ale i možnost využití nových metod s tím spojených. V naší práci jsme se rozhodli zabývat propojením systému Lab-on-valve s metodou extrakce na tuhou fázi. Ale na rozdíl od metody využívající zapojení klasických SPE kolonek, my jsme se jako jedni z prvních na naší fakultě pustili do použití nástřiku kuliček sorbentu přímo dovnitř systému tzv. bead injection. Tato obměna přináší výhodu v automatické obnově sorbentu po každé analýze, naproti tomu použití volných kuliček mimo kolonu může vést k problémům s robustností metody.

V této práci se pokusíme ukázat možnosti extrakce a stanovení systému LOV na léčivu ze skupiny diuretik – amiloridu, na základě zkušeností z metody taktéž vyvinuté na Katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Ta popisovala extrakci a stanovení amiloridu z moči propojením SPE se systémem sekvenční injekční analýzy.

Amilorid je kalium šetřící diuretikum, které se v klinické praxi široce využívá při léčbě hypertenze. Jeho účinek spočívá ve zvyšování hladiny draslíku v organizmu, která může být snížena například jinou související léčbou. A jelikož je draslík nejdůležitější intracelulární iont, je i sledování amiloridu v biologickém materiálu velmi důležité.

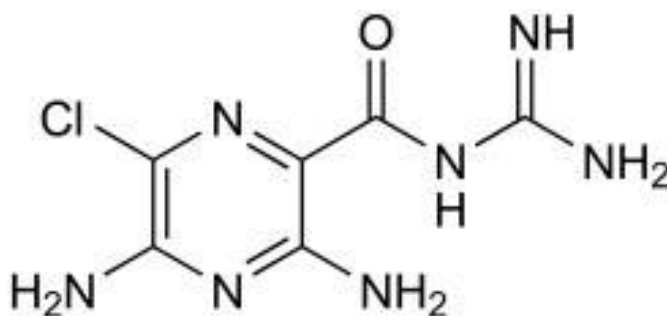
2. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo prověřit možnost využití systému LOV v extrakci a následném stanovení amiloridu z lidské moči za pomoci fluorescenční detekce na základě metody vyvinuté na Katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové. V této práci byl amilorid extrahován za pomoci SPE mikrokolony, která byla spojena se systémem SIA. Vzhledem k acidobazickým vlastnostem a polaritě molekuly byla zvolena kolona s iontovýměnným sorbentem. Eluce probíhala elučním činidlem 0,01 M HNO₃ + 0,1 M KCl, rychlost průtoku 20 µl/s. Vzorek byl rozpuštěn v moči desetkrát zředěné a detekován byl pomocí fluorescenčního spektrometru. Analýza probíhala 8 minut.

Seznámení se s chováním kuliček sorbentu Sephadex-CM C-25 Ion-exchange v systému Lab-on-valve má pomoci při jejich následném využití pro vývin metody Bead injection v tomto systému. Po ustanovení podmínek metody má být provedena její validace.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Amilorid hydrochloridum dihydricum



Obr. 1 – vzorec amiloridu

- Sumární vzorec:** $C_6H_9Cl_2N_7O \cdot 2H_2O$
- Chemický vzorec:** dihydrát 3,5-diamino-6-chlor-*N*-karbamimidoylpyrazin-2-karboxamid-hydrochloridu
- Molekulová hmotnost:** 302,12 (266,09 bezvodého)
- CAS:** 17440-83-4
- Obsah:** 98,0% až 101,0% počítáno na bezvodou látku
- Fyzikální a chemické vlastnosti:** světle žlutý nebo zelenožlutý prášek
těžce rozpustný ve vodě a v ethanolu bezvodém [1]
- MÚ:** Patří mezi kalium šetřící diuretika. Tato diuretika zabraňují vstupu Na^+ natriovým kanálem do buňky tubulárního epitelu a zpomalují tak výměnu kationtů. Účinek se projeví zvýšeným vylučováním natria a šetřením kalia.
- FK:** Podává se per os, ze střeva se resorbuje špatně (15-30%) a s velkou individuální variabilitou. Maximálního účinku je dosaženo za 6 hodin po podání, účinek odezní za 24 hodin po aplikaci. Z největší části se vyloučí močí v nezměněné podobě ($t_{1/2}$ =6-9 hodin).
- Použití:** Přednostní indikací diuretik šetřící kalium je hypertenze, kdy se podává dlouhodobě v kombinaci s benzothiadiaziny (např. hydrochlorthiazid). Amilorid snižuje nebezpečí, že by thiazidová diuretika vyvolala hypokalemii.
- Dávkování:** 5 - 10 mg denně.

NÚ: Hyperkalémie v souvislosti s jeho hlavním účinkem. Poruchy trávicího ústrojí [2].

3.2. Extrakce na tuhou fázi

Extrakce na tuhou fázi (Solid phase extraction, dále jen SPE) je v současné době asi nejrozšířenější metoda přípravy vzorku. Její podstatou je zachycení molekul látky na tuhém sorbentu, přes který protéká vzorek. Ze statistického výzkumu vyplývá, že právě na přípravu vzorku a zpracování dat se spotřebuje přibližně 85% času spojeného s chromatografickou analýzou, proto je třeba extrakci věnovat odpovídající pozornost.

Extraktí sledujeme především dva cíle:

- separaci analytu od interferujících balastů
- zakoncentrování analytu pro zvýšení citlivosti následně použité metody.

3.2.1. Vývoj a princip SPE

Tato metoda byla popsána koncem 70. let, ale její vývoj byl ze začátku velmi pomalý ve srovnání s jinou metodou, tehdy velmi rozšířenou, kterou byla extrakce kapalina-kapalina (liquid-liquid extraction, LLE). Masivní vzestup SPE můžeme sledovat v letech devadesátých v souvislosti se snahou chemiků omezit organická rozpouštědla, která jsou u LLE využívána v mnohem větších objemech. Dalším důvodem bylo i rozšíření nabídky sorbentů.

SPE je technika, ve které se analyt sorbuje na pevné fázi z fáze kapalné. Je založena na silnějších interakcích analytu s pevnou fází, než s fází kapalnou, v které je analyt rozpuštěn. Sorbent je uložen v trubičkách z polypropylenu, popřípadě ze skla, nebo slisován se skleněnými vlákny do disků. Mechanismus retence je v podstatě stejný jako v kapalinové chromatografii, a proto i sorbenty jsou velice podobné. Používají se chemicky reverzní fáze na bázi silikagelu, normální fáze, iontově výměnné fáze a celá řada dalších sorbentů. Metoda je rychlá, přesná a snadno reprodukovatelná [3].



Obr. 2 – kolony a disky používané v klasickém SPE [3]

3.2.2. Sorbenty

Nejdůležitějším krokem je volba správného sorbentu. Proto je před výběrem zapotřebí zjistit co nejvíce dat o vzorku, tzn. uvážit vlastnosti matrice a analytu, a na základě těchto znalostí potom zvolit i typ fáze a velikost kolonky. SPE je extrakční postup, ve kterém se uplatňuje rovnováha mezi fází tuhou a kapalnou. Analyty, které nás zajímají, ale i interferující látky, jsou ve fázi kapalné. Jsou udržovány na tuhém sorbentu, v kolonkách nebo discích. Sorbent má vyšší zrnění než u kapalinové chromatografie, proto lze pracovat při nízkém tlaku i přetlaku a vyšších průtokových rychlostech.

Sorbenty v SPE jsou nejčastěji na bázi chemicky modifikovaných částic silikagelu. Při této modifikaci se na povrchové silanolové skupiny chemicky navazují skupiny různých vlastností, které rozhodují o vlastnostech sorbentu. Chemicky vázané fáze vznikají již známou reakcí povrchové silanolové skupiny silikagelu s trialkylchlorsilany.

Při separaci využíváme různé mechanismy zachycování látek. Tyto mechanismy spočívají v odlišných molekulárních interakcích mezi analytem a sorbentem. Mezi běžně uplatňované interakce patří tyto:

- van der Waalsovy síly („nepolární“ interakce)
- vodíkové vazby a dipól-dipólové interakce („polární“ interakce)
- kation-aniontové interakce (iontové interakce typu elektrostatických přitažlivých sil mezi opačně nabitými ionty).

3.2.3. Instrumentace

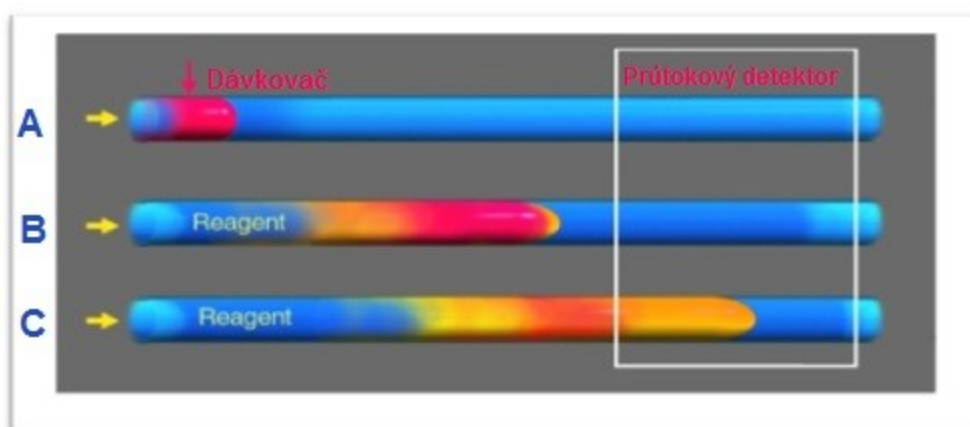
- Kapalný vzorek je veden přes SPE kolonku a sloučeniny jsou ze vzorku zachyceny materiálem sorbentu v koloně.
- Nežádoucí příměsi mohou být z kolonky selektivně odstraněny promytím správně zvolenými rozpouštědly.
- Nakonec mohou být z kolonky žádoucí analyty vymyty elučním rozpouštědlem v podobě čistého extraktu [4].

3.3. Průtokové metody

Od moderní analytické chemie je vyžadováno zpracování velkého množství vzorků s dostatečnou citlivostí, přesností, spolehlivostí a především rychlostí. K tomuto účelu byla vyvinuta řada technik, které umožňují racionalizovat a automatizovat složité postupy při analýze velkých serií vzorků instrumentálními metodami. Mezi ně patří i průtokové analytické techniky, prezentované především systémy FIA a SIA. Systém FIA patří do první generace průtokových analytických metod, byl popsán Růžickou a Hansenem v roce 1974 [5]. Systém SIA prezentuje druhou generaci průtokových metod, popsán byl Růžickou a Marshalllem v roce 1990 [6]. Zatím poslední generaci zastupuje systém Lab-on-valve společně s bead injection (2000) [7] a metoda sekvenční injekční chromatografie (2003) [8].

3.3.1. Průtoková injekční analýza (FIA)

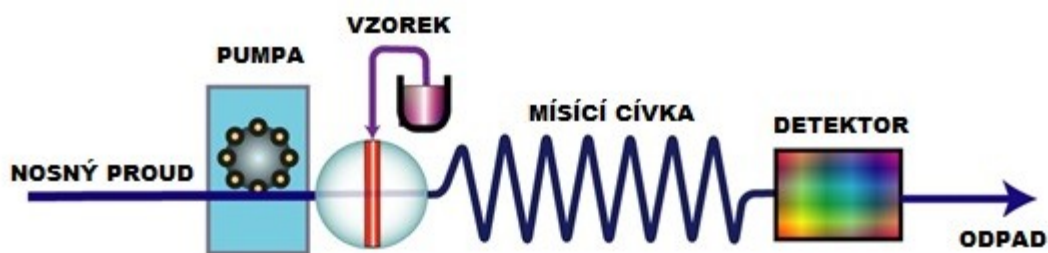
FIA je kontinuální průtoková metoda, kde je, ve své nejjednodušší formě, přesný objem vzorku injikován do konstantního proudu nosného činidla (A). Jak se červená zóna vzorku postupně pohybuje systémem (B), mísí se procesem disperze s činidlem a vytváří produkt (žlutá), např. barevná reakce, který je detekovaný vhodným detektorem (C), např. UV detekce [9].



Obr. 3 – princip FIA [9]

Nejzákladnější systém průtokové analýzy obsahuje peristaltickou pumpu, která pohání nosný proud skrz dávkovací ventil, reakční cívku a detektor do odpadu. Dávkovač dokáže v jednoduché smyčce nastříkávat pouze fixní objem a pumpa vytváří konstantní nosný proud, proto nelze bez fyzické přestavby systému jednoduše upravovat

objem vzorku a reakční čas. Míra mísení a reakční doba je regulována rychlostí průtoku, objemem kanálu, popřípadě jeho geometrií [10].



Obr. 4 - základní schéma systému FIA [9]

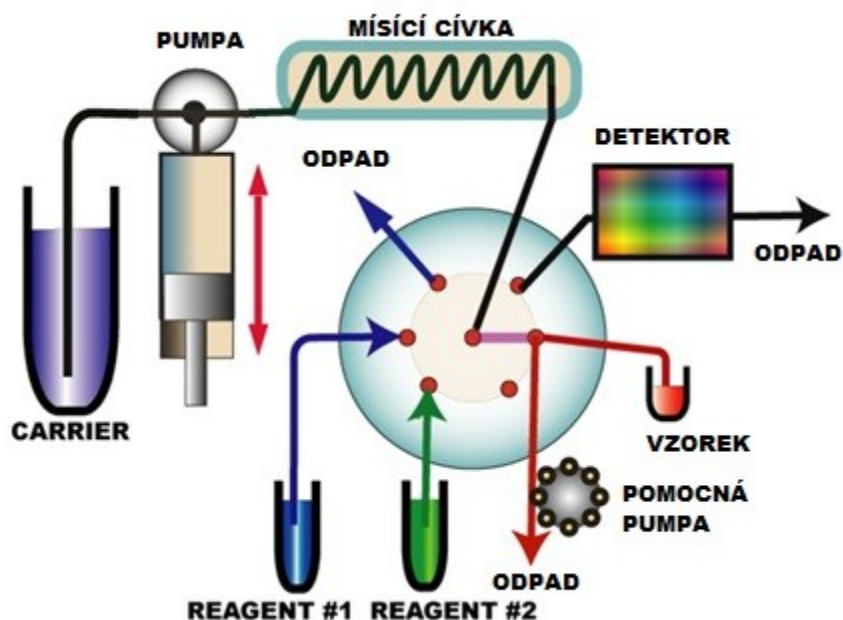
3.3.2. Sekvenční injekční analýza (SIA)

Sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis, SIA) patří již do druhé generace průtokových analytických metod. Oproti systému FIA využívá odlišný princip, jehož charakteristickým rysem jsou oddělené měřicí cykly. Nejprve jsou zóny nosného proudu (carrier), vzorku a činidla postupně aspirovány do jednonábového systému s využitím selektivního vícecestného ventilu a pístového (popř. peristaltického) čerpadla. Poté je pohyb pístu obrácen, čímž dojde k promísení zóny vzorku a činidla a vzniklý produkt je dopraven do detektoru. Je získán výsledný analytický signál ve formě píku, podobně, jako je tomu u FIA. V podstatě se jedná o záznam změny koncentračního gradientu reakčního produktu při průchodu zóny detektorem. Rozdíly se projevují v geometrii nosného proudu, FIA využívá konstantní tok, zatímco základem SIA jsou změny přímého a zpětného toku. Tím je dosaženo vyššího stupně konverze analytu na výsledný produkt.



Obr. 5 – princip SIA [9]

Typická základní konfigurace příslušného SIA systému je tvořena vícecestným selekčním ventilem, jehož centrální port je spojen s dvousměrným pístovým čerpadlem, který je schopen aspirovat přesně určený objem vzorku nebo činidla do mísící cívky, spojovacím materiálem (obvykle polymerové hadičky s vnitřním průměrem 0,7 - 0,8 mm) a vhodným detektorem. V podstatě se dá říci, že SIA pracuje v cyklu naprogramovaných pohybů pístu čerpadla, synchronizovaných s přepínáním pozic selekčního ventilu. Přesná synchronizace a opakovatelnost těchto kroků je nutnou podmínkou k dosažení reprodukovatelné disperze jednotlivých zón v SIA systému a tím k získání reprodukovatelné koncentrace produktu, resp. odpovědi detektoru. Z toho vyplývá, že nezbytnou součástí SIA systému musí být i vhodný počítač s příslušným programovým vybavením, který řídí jednotlivé kroky měřícího cyklu a současně sbírá, uchovává a vyhodnocuje výstupní data [9; 10].



Obr. 6 – základní schéma systému SIA [9]

3.3.3. Porovnání FIA a SIA

Průtokové rychlosti v SIA se prakticky neliší od FIA a pohybují se obvykle okolo 1 ml/min a doba trvání jednoho měřícího cyklu v SIA většinou nepřesahuje třicet sekund, což je v mnoha případech srovnatelné s frekvencí dávkování vzorku ve FIA. Zatímco ve FIA je v rámci jedné série měření dávkovaný objem vzorku fixní, což je dáno konstantní délkou dávkovací smyčky, u SIA je možno v jednotlivých cyklech

objem vzorku cíleně měnit v rozsahu jednotek až stovek μl programováním doby otevření příslušného kanálu selekčního ventilu.

Nevýhody SIA oproti FIA vidí autoři zejména v poněkud snížené frekvenci dávkování vzorku a v nutnosti používat poměrně složitou počítačovou techniku. Na druhé straně má SIA proti FIA nesporné výhody. Analýza probíhá v jednobanálním uspořádání s jedním ventilem a jedním čerpadlem, i když používáme více roztoků. Při zastaveném toku je možné provádět kinetická měření např. určovat řád reakcí, podobně jako ve FIA. Protože SIA využívá zastavení a změnu směru toku, jsou spotřeby vzorku a hlavně činidel podstatně nižší než u systému FIA, kde je čerpání kontinuální. Velkou výhodou je i flexibilita daná snadnou změnou parametrů měření prostřednictvím počítače, aniž by bylo třeba měnit konfiguraci SIA systému [9; 10].

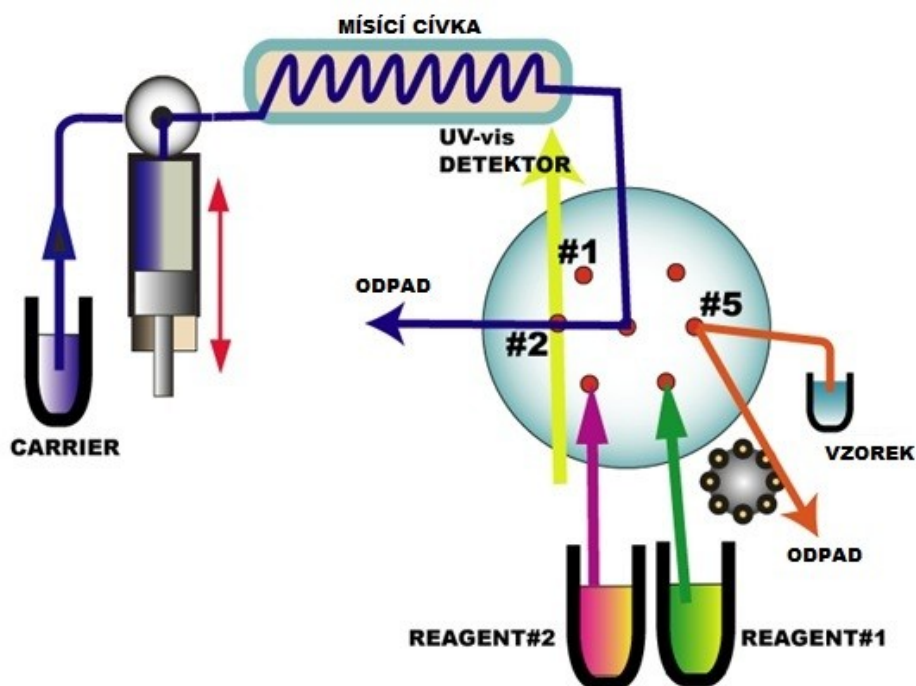
3.4. Lab-on-valve

3.4.1. Vývoj a princip LOV

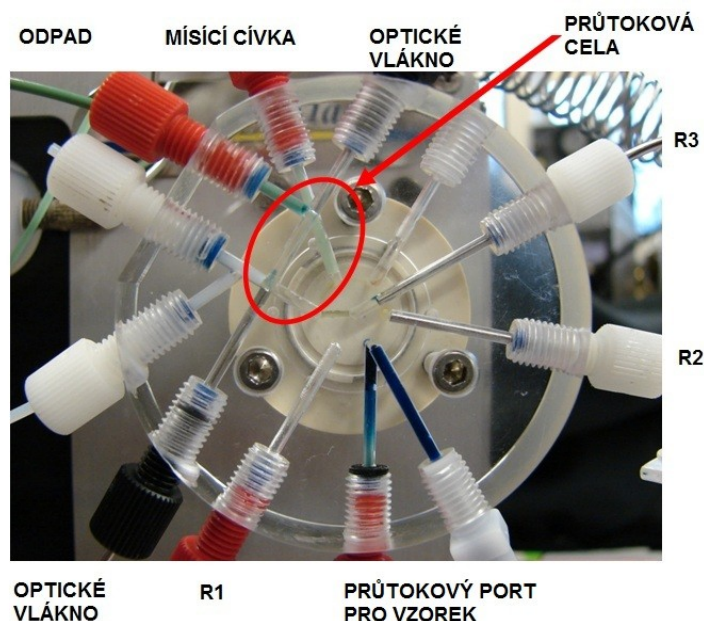
Lab-on-valve (dále jen LOV) patří do třetí generace analytických průtokových metod a navazuje na systémy FIA a SIA. Systém LOV byl popsán Růžičkou v roce 2000. Analýzy často vyžadují drahé a nebezpečné reagenty, proto byla vyvinuta snaha miniaturizovat předchozí systémy, tak aby se snížila jejich spotřeba, a tím jsme získali co možná nejekonomičtější a nejbezpečnější analytickou metodu. Toho se u systému LOV snažili autoři dosáhnout dvěma způsoby:

- optimalizováním vzdálenosti mezi dávkovačem a detektorem; a
- záměnou kontinuálního nosného proudu za libovolně programovatelný (zastavení, obrácení nebo akcelerace proudu) [11].

Výsledkem vývoje je takzvaný Lab-on-valve Manifold (nástavec) který umožňuje zmenšení konvenčního SIA systému, tím, že integruje průtokovou celu s ostatními komponenty zařízení (spoje, mikrokolonky, průtokový port pro vzorky a mísící zařízení) do kompaktní konstrukce, která je upevněna na vrcholu standardního vícecestného ventilu (MPV). Centrální port nástavce bývá obvykle spojen s mísící cívkou, díky čemuž má centrální port přístup k portům po obvodu skrze mělké drážky na rotujícím povrchu MPV. Při použití neupravených biologických vzorků je vhodný



Obr. 7 - schéma systému LOV [9]



Obr. 8 - detail nástavce LOV [9]

široký průměr kanálu (1,61 mm) nástavce, který umožňuje přizpůsobit se příslušné substanci a předejít ucpaní systému. Vnitřní povrch je hladký a má krátké vzdálenosti mezi kanály pro minimalizaci interferencí mezi jednotlivými analýzami. Průtoková cela může být snadno modifikována pomocí optických vláken na příslušnou spektroskopickou metodu (UV-VIS, spektrofotometrie, fluorescence, chemiluminiscence) a podobně i za pomoci elektrod na metodu elektrochemickou (voltametrie, konduktometrie, potenciometrie).

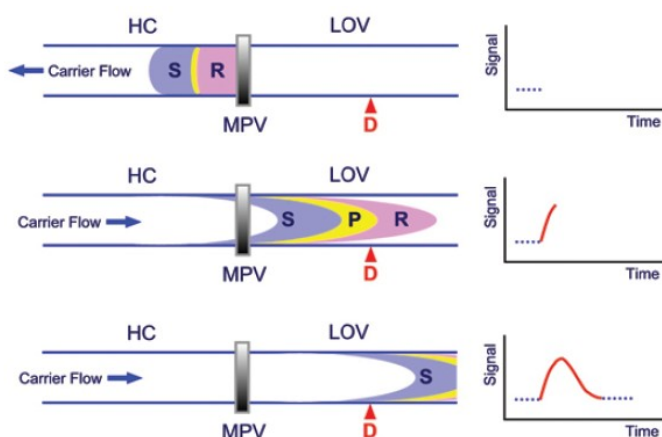
Nástavec LOV společně s vícecestným ventilem a pohonnou jednotkou (standardně pístová pumpa podobná systému SIA) tvoří systém LOV, někdy je též nazývaný SI-LOV nebo μ SI-LOV. Díky integraci všech prvků je celý systém přenosný. Má velikost půdorysu asi poloviny přenosného počítače. Během jednotlivých analýz pracuje s objemy reagensů a vzorků v řádech desítek μ l a spotřeba nosného média se pohybuje ve stovkách μ l. Další výhodou konceptu LOV je i lepší transparentnost pro uživatele [7; 9; 12; 13]

3.4.2. Detekční módy v SI-LOV

Na rozdíl od standardního dávkového způsobu analýzy, v systému SI-LOV (podobně jako u ostatních průtokových metod) není zapotřebí, aby došlo k úplné rovnováze chemické reakce. A protože všechny reakce jsou závislé na čase, je načasování operací manipulace se vzorkem rozhodující pro úspěch chemických analýz založených na průtokových metodách [14].

Metoda kontinuálního proudu

Nosný proud v metodě kontinuálního proudu, který prochází skrz celý systém od dávkování vzorku až po detekci se stabilní rychlostí, zajišťuje produkt, který vzniká reakcí, jejíž délka je právě definována vzdáleností mezi místem nástřiku vzorku po místo, kde se produkt detekuje. Zrychlený proud zajišťuje lepší mísení vzorku s reakčním činidlem, ale zároveň neposkytuje dostatečný čas pro vytvoření reakčního produktu. Naproti tomu pomalejší rychlost zajišťuje delší reakční čas, ale prostupnost vzorku je menší a navíc zvyšujeme možnost přenášení vzorku do další analýzy.

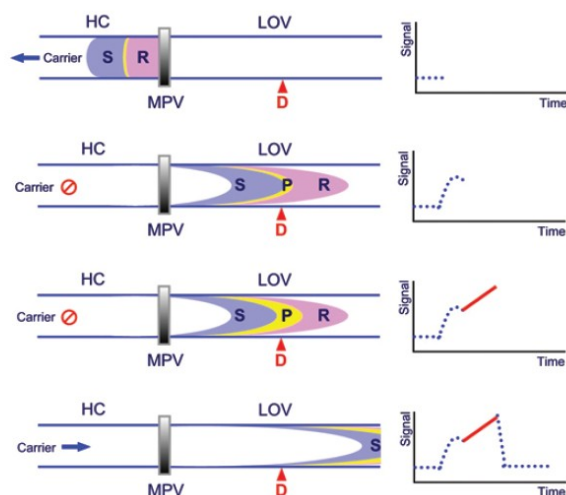


Obr. 9 – princip metody kontinuálního proudu

S – vzorek; R – činidlo; P – produkt; D – detektor;
HC – mísící cívka; MPV – vícecestný ventil;
Carrier flow – nosný proud [14]

Metoda stopped-flow

Metoda stopped-flow je založena na zastavení určených vrstev vzorku a činidla v místě detektoru ještě před dosažením rovnováhy, tam teprve vzniká produkt reakce, který je detekován. Poté je z detektoru vypláchnut, abychom získali základní linii odezvy. Stopped-flow zajišťuje delší reakční čas a tím zvyšuje i citlivost analýzy, navíc umožňuje zkrátit vzdálenost mezi dávkovačem a detektorem, čehož využívá právě systém LOV. Samozřejmě pracuje s menšími objemy reagentů a tím snižuje i produkci odpadu.



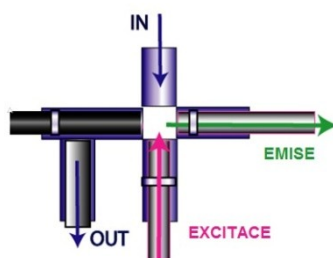
Obr. 10 - princip metody stopped-flow

S – vzorek; R – činidlo; P – produkt; D – detektor;
 HC – mísicí cívka; MPV – vícecestný ventil;
 Carrier flow – nosný proud [14]

3.4.3. Fluorescenční spektrometrie v systému LOV

Fluorescenční spektrometrie je po UV-VIS spektrofotometrii druhou nejpoužívanější detekční metodou, jak u analýz biomolekulárních, tak i u analýz anorganických a organických molekul. Fluorescence je v podstatě luminiscence, což je emise světla (fotonu) látkou. Ta může nastat při návratu elektronu po jeho excitaci na základní stav. Excitace u fluorescence bývá vyvolána absorpcí ultrafialového záření a po odstranění zdroje záření mizí [4].

U formátu LOV je excitace vyvolána jedním optickým vláknem, ke kterému je kolmo postavené druhé optické vlákno, které zachycuje vyzářené emise. Detekce probíhá v průtokové cele systému LOV, který může být naplněn tekutinou, nebo kuličkami, které budou popsány v systému Bead Injection (BI). Protože celou můžeme vybavit i třetím vláknem, lze současně snímat i absorbance, popřípadě můžeme sledovat i jiné vlastnosti v závislosti na fyzické konfiguraci systému [9].



Obr. 11 - schéma zapojení optických vláken pro fluorescenci v systému LOV [9]

3.5. Bead Injection

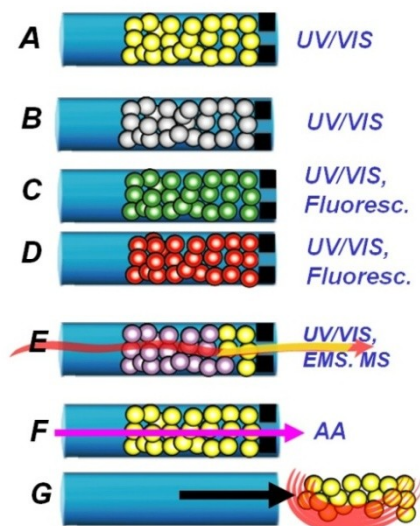
Bead Injection (BI) patří do třetí generace průtokových metod podobně jako LOV, metoda byla popsána již v roce 1994, ale až její spojení se systémem LOV přineslo opravdu spolehlivé výsledky, proto její využití můžeme sledovat až během posledních několik let pod názvem BI-LOV, BI-SI-LOV, popřípadě BI- μ SI-LOV.

Základním principem metody jsou mikrosféry (kuličky) vpraveny do systému, kde jsou zachyceny v určeném místě, následně je na ně nastříknut vzorek. Komponenty vzorku reagují s funkčními skupinami na povrchu kuliček a zachycují se, poté jsou analyzované molekuly detekovány za pomoci spektrofotometru (Bead Injection Spectroscopy) a to ve své ryzí formě, popřípadě po barevné reakci in situ. Analyzované molekuly mohou být taktéž eluovány a detekovány až po vymytí z kuliček. Na konci analýzy jsou kuličky transportovány zpětným chodem proudu na jiné místo nebo do odpadu. Unikátní na tomto systému je automatizovaná obnova reaktivní báze v podobě kuliček po každém testu [9; 15].

3.5.1. Princip detekce v BI

V současné době se využívají dvě strategie detekce analytu:

- Bead Injection spektroskopie - je metodou volby, když na kuličkách zachycený analyt je schopen absorpce světla ve své nativní formě, nebo reaguje s funkčními skupinami na povrchu kuliček za vzniku detekovatelného produktu (A). Pokud nejsou molekuly analytu schopné světelné absorpce, můžeme BIS použít až po dodatečné reakci na kuličkách s fluorogenními látkami (C), nebo po enzymové reakci (D). Detekce pak probíhá přímo na zachycených kuličkách.
- Bead Injection separace - eluce z kuliček – podobně jako u SPE, je v tomto případě analyt na kuličkách zakoncentrován a poté je eluován příslušnými elučním činidlem do detektoru (např. UV-VIS, MS, AA), kde je pak detekován (E,F) [9; 16].



Obr. 12 - princip detekce v bead injection [9]

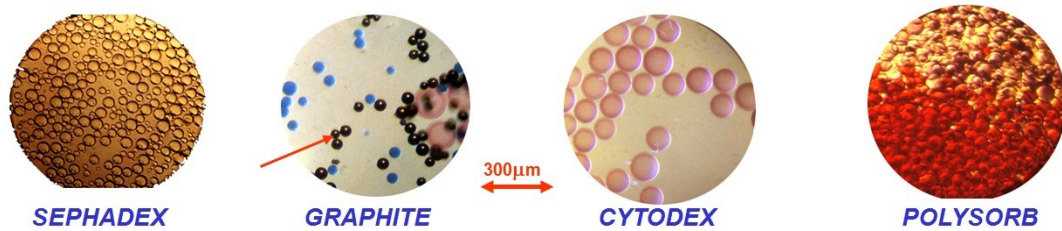
3.5.2. Kuličky (Beads)

Mezi rozhodující vlastnosti patří velikost, tvar a materiál kuliček. Tyto vlastnosti musí být splněny pro aplikaci BI. Vyžadovány jsou částice sférické, od 20 do 150 μm velké. Menší kuličky je složitější zachytit a promýt, zatímco větší se mohou zachytit v průtokových kanálech a vytvořit „ucpávku“. Měkké polymerní kuličky jsou preferovány před tuhými (sklo, křemen), které mohou poškrábat systém. Pro BIS je dalším důležitým kritériem i průhlednost. Kuličky vyrobené ze Sephadexu (sesítěná čištěná galaktóza z mořských řas) a Sepharosy (sesítěná mikrobiální glukóza) jsou pro aplikace BI ideální, protože všechna kritéria splňují. Navíc jsou k dostání v široké škále funkčních skupin. Pro anorganické analýzy, předkoncentrování stopových prvků nebo selektivní zachycení biomolekul (protilátky, antigeny) jsou využívány kuličky potažené Proteinem A (*S.aureus*), Proteinem G (*S.G148*), avidinem (glykoprotein z vaječných bílků), streptavidinem (*S.avidinii*), C-18 nebo iontovýměnnou vrstvou. Cytodexové kuličky jsou používány jako nosiče pro živé buňky sledované fluorescenční spektrometrií a nakonec kuličky grafitové jako obnovitelné voltametrické elektrody u enzymových analýz. Typický objem kuliček na jednu analýzu je přibližně 2 - 10 μl , což odpovídá množství asi 2 000 - 10 000 kuliček.

K docílení reprodukovatelného množství kuliček v každé analýze, můžeme použít dvě metody:

- plnění kuliček do přesně definované dutiny
- odměření fixního objemu přesně definované suspenze kuliček

U obou způsobů je velmi důležité mít suspenzi kuliček v rezervoáru dobře promíchanou, abychom zabránili aspiraci kuliček ze sedimentu a tím možnému ucpání systému. Toho docílíme magnetickým nebo mechanickým míchadlem v závislosti na typu materiálu kuliček. Koncentrace kuliček v roztoku by měla být okolo 20 %. Délka trubičky mezi baňkou s roztokem a LOV by měla být co nejmenší, protože usazené kuličky v přívodu by mohly vést k nereprodukovatelným výsledkům. Navíc je možné trubičku před každou aspirací propláchnout [9].

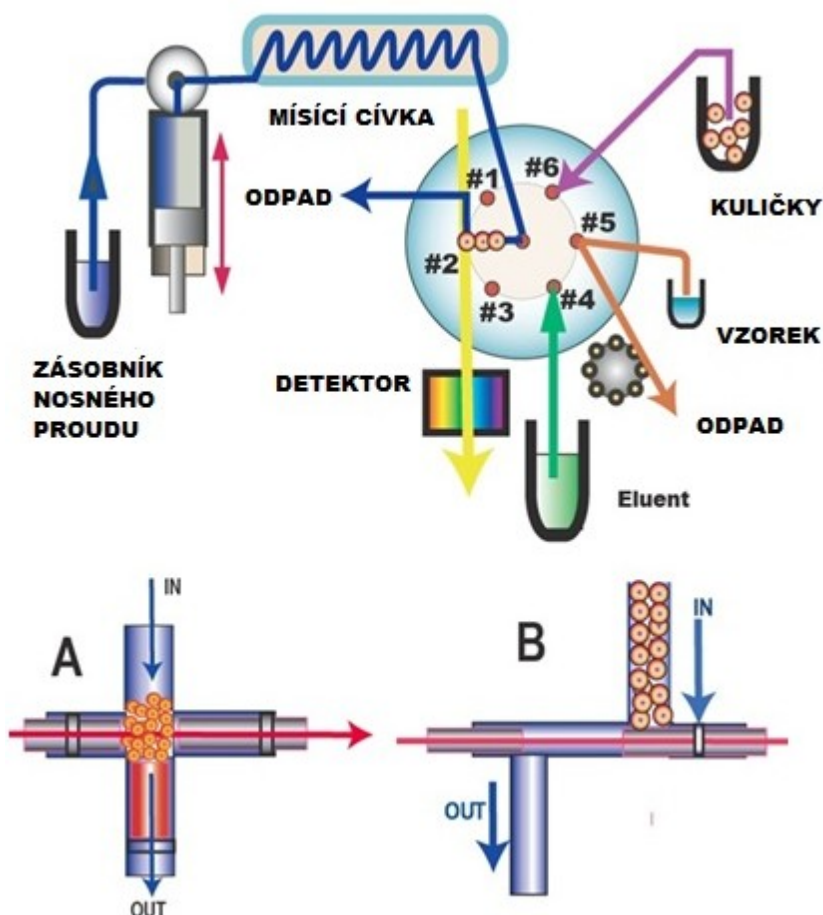


Obr. 13 - detail sorbentů používaných u bead Injection [9]

3.5.3. BI ve formátu LOV

Suspenze kuliček se zpětným proudem nasaje skrze port č. 6 do mísící cívky (viz. Obr. 14 – schéma zapojení pro bead injection v systému LOV), poté se ventil přepne na port č. 2 a kuličky jsou přeplněny do průtokové cely a tam zadrženy dutou ucpávkou (A), nebo za pomoci optického vlákna (B).

Průtoková cela na obrázku A je vhodná pro BIS, zatímco ta na obrázku B se využívá pro monitorování eluovaných látek, podobně jako je tomu u obnovitelné BI chromatografie (renewable BI chromatography). Modul LOV je vhodné natočit tak, aby průtoková cela byla umístěna vertikálně, jako je tomu na obrázku, zajistíme tím lepší zadržení kuliček za pomoci gravitace. Reprodukovatelné plnění kuliček je zajišťováno středně rychlým proudem (okolo 50 $\mu\text{l/s}$). Perfúze vzorku pak probíhá za pomalých rychlostí (většinou 1-5 $\mu\text{l/s}$). Vyprázdnění se uskutečňuje obvykle rychlým zpětným proudem (okolo 200 $\mu\text{l/s}$) na konci analýzy [9; 17].

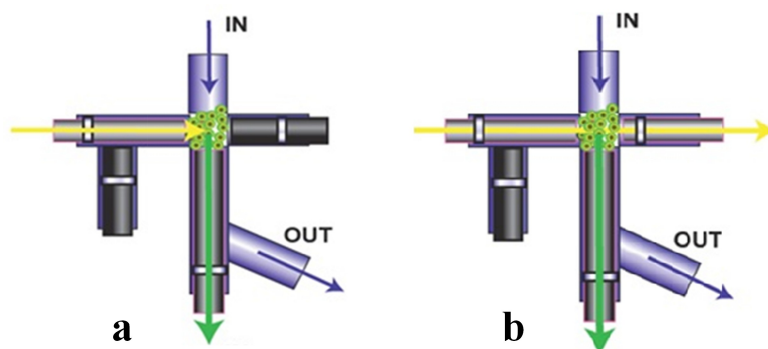


Obr. 14 – schéma zapojení pro bead injection v systému LOV [9]

3.5.4. Konfigurace průtokové cely

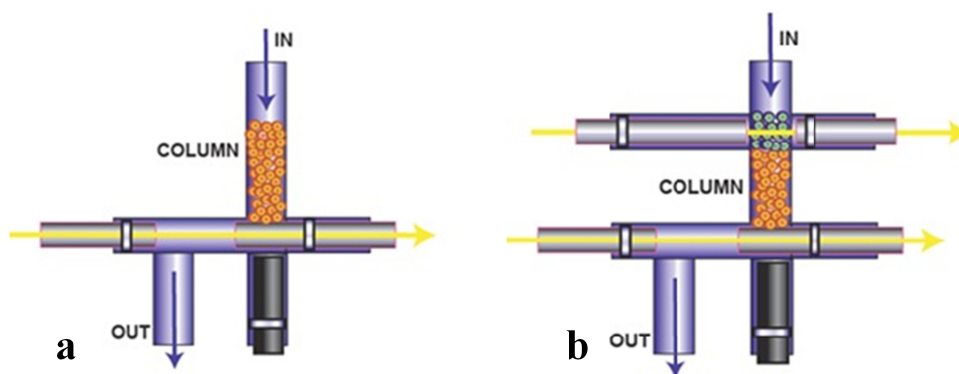
Pro zachycení kuliček sorbentu se používá několik různých zapojení:

- Fluorescence bead spectroscopy – používá pár vláken umístěných v pravém úhlu. Kuličky jsou zachyceny v místě vertikálního optického vlákna (Obr. 15 a).
- Podobně UV-VIS a fluorescence používá tři optická vlákna konfigurovaná jak je vidět na obrázku dole (Obr. 15 b).



Obr. 15 – zapojení průtokové cely pro fluorescenční spektroskopii (a) a pro kombinaci UV-VIS a fluorescence (b) v bead injection [9]

- U mikrokolonové chromatografie (microcolumn chromatography) s obnovitelnou kolonou je optická dráha definována vzdáleností mezi optickými vlákny. Sloupec kuliček je v tomto případě zachycen nad jedním z optických vláken (Obr. 16 a).
- BIS kombinované s microcolumn chromatography využívá dva páry optických vláken. Horní pár monitoruje kolonku, spodní průtokovou celu. Sloupec kuliček je zachycen nad jedním z optických vláken (Obr. 16 b) [9].



Obr. 16 – zapojení průtokové cely pro mikrokolonovou chromatografii (a) a pro kombinaci mikrokolonové chromatografie s BIS (b) [9]

3.6. Metody stanovení amiloridu

Odborná literatura uvádí mnoho různých metod stanovení amiloridu, jak v léčivých přípravcích, tak v biologickém materiálu jako je plazma nebo moč. Pro ilustraci uvádíme krátký seznam popsaných metod:

- HPLC [18]
- FIA [19]
- SIA-SPE [20]
- Spektrofotometrie [21]
- Ramanova spektrometrie [22]
- Chemiluminiscenční oxidace [23]
- Fluorimetrie [24; 25]
- Kapilární izotachoforéza [26]
- Diferenční pulzní voltametrie [27]
- Diferenční pulzní polarografie [28]

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použité přístroje, chemikálie a příprava vzorků

4.1.1. Přístrojové vybavení

- FIALab[®] MicroSIA systém – Lab-on-valve (FIALab[®] Instruments, USA)
- Software FIALab for Windows 5.9[®]
- Detektor Ocean Optics 2000 – FL (Ocean Optics Inc., USA)
- Převodník A/D Ocean Optics SAD 500 (Ocean Optics Inc., USA)
- UV-VIS-NIR lampa Mikropack DH-2000-CAL (Ocean Optics Inc., USA)
- Optická vlákna, průměr 400 μm (FIALab[®] Instruments, USA)
- Hadičky o vnitřním průměru 0,7 mm (PTFE)
- Analytické váhy Santorius analytic
- Ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex[®] RK 100
- Vialky 5 ml
- Míchačka IKA MS 3 basic
- Automatické pipety Biohit
- Špičky na automatické pipety

4.1.2. Chemikálie

- Kuličky Sephadex-CM C-25 Ion-exchange, Aldrich (40-120 μm , CAS 62886-59-3)
- Amilorid hydrochlorid, ICN Biomedicals Inc. (CAT No. 153537)
- Chlorid draselný p.a. (Lachema)
- Kyselina dusičná 65% p.a. (Penta)
- Voda R
- Moč

4.1.3 Příprava roztoků

Příprava elučního činidla 1 (0,075 M HNO₃ + 0,05 M KCl)

Eluční roztok byl připraven smísením dvou roztoků o přesné koncentraci 0,15 M kyseliny dusičné a 0,1 M chloridu draselného. První roztok obsahoval 0,260 ml 65 % kyseliny dusičné vodou v odměrné baňce o objemu 25,00 ml. Druhý roztok obsahoval

navážku 0,1838 g chloridu draselného a taktéž byl rozpuštěn a doplněn vodou v odměrné baňce o objemu 25,00 ml.

Příprava elučního činidla 2 (0,25 M HNO₃ + 0,05 M KCl)

Eluční roztok byl připraven smísením dvou roztoků o přesné koncentraci 0,5 M kyseliny dusičné a 0,1 M chloridu draselného. První roztok obsahoval 0,870 ml 65% kyseliny dusičné vodou v odměrné baňce na 25,00 ml. Druhý roztok obsahoval navážku 0,1916 g chloridu draselného a taktéž byl rozpuštěn a doplněn vodou v odměrné baňce na 25,00 ml.

Příprava zásobního roztoku standardu amiloridu

Odměrný roztok o koncentraci 100 µg/ml, byl připraven rozpuštěním přesně asi 0,25 mg hydrochloridu amiloridu ve vodě v odměrné baňce o objemu 25,00 ml. K usnadnění rozpouštění byla využita ultrazvuková lázeň. Odměrný roztok byl uchováván v lednici bez přístupu světla po dobu dvou týdnů bez problémů se stabilitou.

Příprava vzorku ve vodě

Vzorek byl připraven ze zásobního roztoku o koncentraci 100 µg/ml na požadovanou koncentraci naředěním vodou R v odměrných baňkách o objemu 10,00 ml.

Příprava vzorku v moči

Moč byla před analýzou desetkrát zředěna vodou R a poté do ní byl přidán určený objem zásobního roztoku amiloridu, abychom získali jeho požadovanou výslednou koncentraci ve vzorku (0,20; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 5,00; 10,00; 20,00; 30,00 µg/ml). Roztok amiloridu byl přidáván do moči vždy těsně před analýzou.

Příprava kuliček

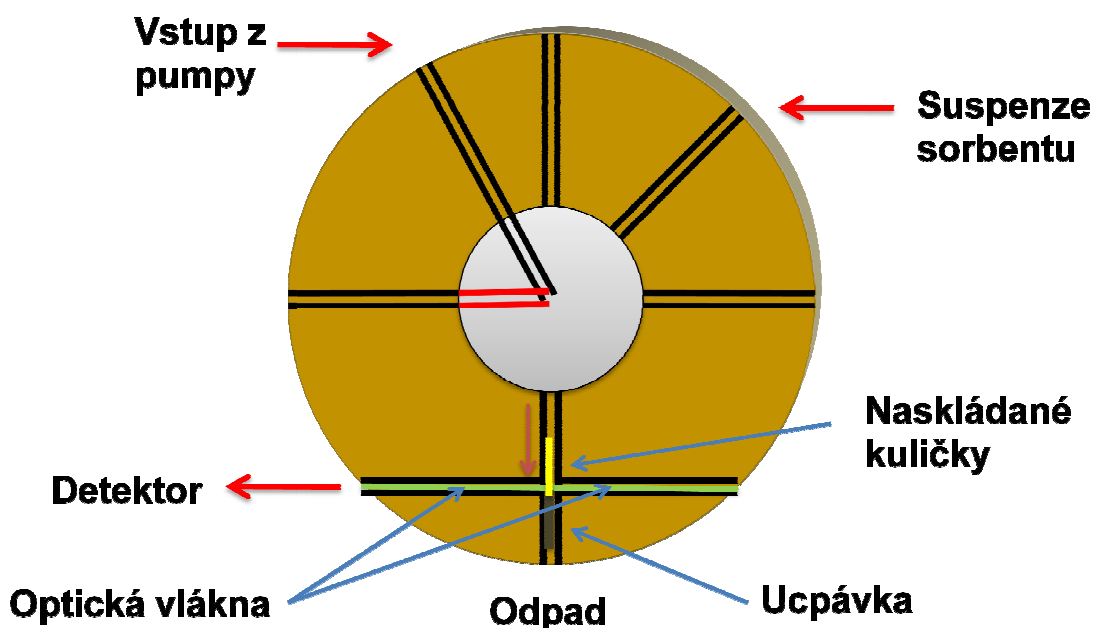
Suspenzi kuliček byla připravena rozptýlením asi 0,0360 g kuliček v 3,5 ml vody. Kuličky byly obměňovány přibližně po deseti analýzách a jejich rovnoměrný rozptyl byl zajištěn mechanickou míchačkou.

4.2. Optimalizace metody

4.2.1. Optimalizace chování kuliček

Ještě před samotným testováním analýzy bylo potřeba vyzkoušet chování kuliček v systému, protože se práce zabývá metodou BI-SI-LOV na farmaceutické fakultě UK jako jedna z prvních.

Pro testování chování kuliček bylo vytvořeno zapojení popsané na obrázku 17. Nástavec LOV by umístěn tak, aby průtoková cela byla vodorovně. Tím bylo zajištěno lepší udržení kuliček za pomoci gravitace. Systém byl opatřen ucpávkou a optickými vlákny, tímto vznikla v průtokové cele komůrka, do které byly kuličky nastříkávány a následně posílány do odpadu. Průběh děje bylo možné sledovat na záznamu detektoru a zároveň pouhým okem skrz transparentní plast nástavce LOV. Porovnávala se především rychlost a objem kuliček.



Obr. 17 - zapojení nástavce LOV u testování chování kuliček

Testovaný objem suspenze kuliček se pohyboval mezi 80-220 μl . Pro další optimalizaci bylo zjištěno, že nasátý objem by měl být alespoň 200 μl . Pro konečný program byl použit dokonce objem 300 μl , aby byl zajištěn dostatečný objem kuliček pro zachycení analytu.

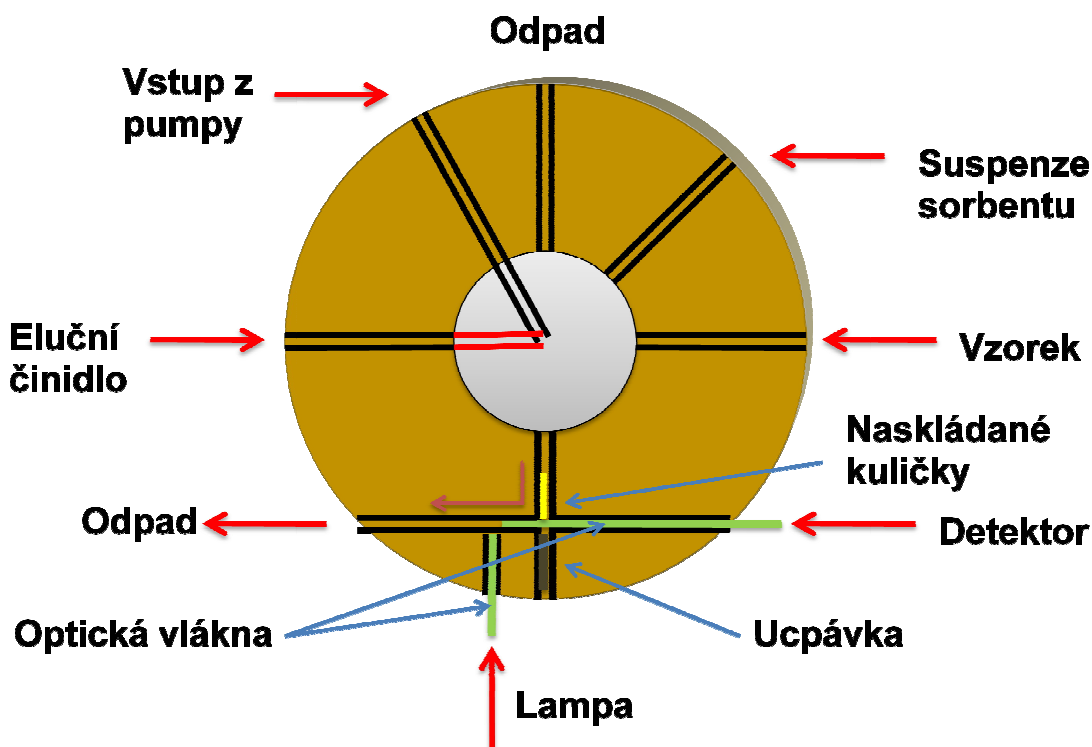
Rychlost nasávání suspenze z rezervoáru byl udržován v nižších řádech (20 $\mu\text{l/s}$), aby kuličky zbytečně nedispergovali v mísící cívce a nasátí proběhlo rovnoměrně. Rychlost nástřiku kolem 50 $\mu\text{l/s}$ zajistila dostatečně rychlé a kompletní

převedení kuliček z mísící cívky do dutiny průtokové cely. Důležité bylo i určení rychlosti nasátí kuliček z dutiny, aby v systému nezůstávala rezidua, byla zkoušena vyšší rychlost. Postupným zrychlováním bylo zjištěno, že je zapotřebí rychlost nejméně 100 $\mu\text{l/s}$. Pro konečný program byla použita dokonce rychlost 150 $\mu\text{l/s}$.

Další důležitý krok, který byl do programu přidán, bylo propláchnutí hadičky mezi zásobníkem se suspenzí kuliček a nástavcem před samotným nasátím kuliček. Tím byly odstraněny zbytky kuliček, které v hadičce mohly zůstat po předchozí analýze, tyto zbytky by následně mohli produkovat pokaždé jiný objem kuliček a snížil by robustnost metody. Hadička by měla být co nejkratší, aby mohl být použit pouze malý objem pro její propláchnutí a nedocházelo k velkému naředění roztoku kuliček. V tomto případě bylo pro propláchnutí použito 110 μl nosného proudu. Objem byl určen matematickým výpočtem objemu trubičky (z délky hadičky a jejího vnitřního průměru).

4.2.2. Zapojení pro optimalizaci metody extrakce a stanovení amiloridu

Pro zkoumanou metodu bylo vytvořeno zapojení nástavce LOV, jako je vyznačené na obrázku 18. Vycházelo se ze zkušeností popsanych Růžičkou na DVD Flow injection analysis – fourth edition [9].



Obr. 18 - zapojení nástavce LOV pro optimalizaci metody extrakce a stanovení amiloridu

4.2.3. Výběr vlnové délky detektoru

Nejlepší hodnotu vlnové délky byla určena proměřením celého emisního spektra roztoku amiloridu. Z této křivky byla následně odečtena vlnová délka emisního maxima (272 nm). Ta byla zadána do programu a používala se na celou dobu testování. Všechny záznamy tedy ukazují intenzitu fluorescence v mV.

4.2.4. Optimalizace objemu a rychlosti nasátí a nástřiku vzorku

Aspirace vzorku probíhala nízkou rychlostí (30 $\mu\text{l/s}$) kvůli zabránění disperze vzorku v mísící cívce a tím i jeho rovnoměrnému nasátí. Objem byl experimentálně stanoven na 300 μl , aby bylo dosaženo přijatelné citlivosti metody.

Při nástřiku byla použita nízká rychlost 10 $\mu\text{l/s}$. Při vyšších rychlostech se stávalo, že amilorid procházel přes zachycené kuličky a nedocházelo k jeho zadržení. Nižší rychlost pravděpodobně pomohla lépe zachytit amilorid na povrchu kuliček. Objem nástřiku byl oproti nasátému vzorku navýšen o 50 μl , aby se zajistilo, že se na kuličky dostane celý vzorek.

Při testování vzorků v sérii se stávalo, že první odezva byla nižší než ostatní. Po několika pokusech jsme došli k závěru, že pro zvýšení robustnosti bude vhodné přidat do programu krok propláchnutí průtokové cely (150 μl , rychlostí 50 $\mu\text{l/s}$) ihned po natažení nosného proudu. Díky tomuto kroku byl ze systému odstraněn balast od předchozí analýzy a metoda se stala více robustní.

Během testování na vzorku v moči se ukázalo, že balast z moči zůstává po nástřiku vzorku v průtokové cele a odezva neklesala až na základní linii. Proto byl do programu po nástřiku vzorku přidán krok, ve kterém byly kuličky se zachyceným amiloridem propláchnuty malým objemem nosného proudu (200 μl vody R). Tento proplach musel probíhat o něco větší rychlostí než nástřik kuliček, aby byl dostatečně vypláchnut balast z moči. Na druhou stranu nemohla být rychlost příliš vysoká, aby nedošlo k vypláchnutí zachyceného amiloridu. Proto byla použita rychlost 20 $\mu\text{l/s}$.

4.2.5. Optimalizace objemu a rychlosti nasátí a nástřiku elučního činidla

Eluce probíhala roztokem elučního činidla, připraveného podle kapitoly o přípravě elučního činidla 1, popř. 2. Objem činidla musel být dostatečný, aby odezva klesla až na základní linii. Experimentálně byl určen objem 200 μl , který tuto podmínku

zajišťoval. Na rychlosti nasátí elučního činidla v podstatě nezáleželo, nicméně byla použita 100 $\mu\text{l/s}$ pro urychlení celkového času analýzy

Průtoková rychlost samotné eluce musela být velmi malá (5 $\mu\text{l/s}$) z důvodu pomalého snímání detektoru (pouze jednou za sekundu), jinak by nebylo možné změřit dostatečný počet bodů v místě píku. Nastříkávaný objem byl nastaven o 50 μl větší, než při nasávání ze zásobní baňky.

Po eluci následovalo pouze odstranění kuliček (viz. 4.2.1.) a vyprázdnění zásobníku s nosným proudem.

4.3. Program

System SI-LOV byl ovládán pomocí počítačového softwaru FIALab for Windows 5.9. Aby mohl systém fungovat samostatně, byl vytvořen program (viz. Tabulka 1 - program používaný při testování). Jednotlivé příkazy byly experimentálně optimalizovány, aby vyhovovaly metodě.

Jedinou částí programu, kterou se lišila analýza ve vodě, od analýzy moči, byl krok propláchnutí kuliček po nástřiku vzorku. Tento krok byl do programu přidán, protože po nástřiku vzorku odezva detektoru nedosahovala základní linie a tímto krokem by problém odstraněn.

Tabulka 1 - program používaný při testování

Popis děje	Jednotka	Příkaz
Měření mV	Spektrofotometr	272 nm
Nasátí nosného proudu	Dvoucestný ventil	Poloha In
	Pumpa Pumpa	Násávání 800 μ l Rychlost 150 μ l/s
	Dvoucestný ventil	Poloha out
Propláchnutí průtokové cely po předchozí analýze	Port 5 Pumpa Pumpa	Vytlačování 150 μ l Rychlost 50 μ l/s
Propláchnutí hadičky od kuliček	Port 7 Pumpa Pumpa	Vytlačování 110 μ l Rychlost 100 μ l/s
Aspirace kuliček	Pumpa Pumpa	Aspirace 300 μ l Rychlost 20 μ l/s
Naskládání kuliček	Port 5 Pumpa Pumpa	Vytlačování 350 μ l Rychlost 50 μ l/s
Aspirace vzorku	Port 6 Pumpa Pumpa	Aspirace 300 μ l Rychlost 30 μ l/s
Nástřik vzorku na kuličky	Port 5 Pumpa Pumpa	Vytlačování 350 μ l Rychlost 10 μ l/s
Propláchnutí kuliček po nástřiku	Pumpa Pumpa	Vytlačování 200 μ l Rychlost 20 μ l/s

Aspirace elučního činidla	Port 4 Pumpa Pumpa	Aspirace 200 μ l Rychlost 100 μ l/s
Eluce z kuliček	Port 5 Pumpa Pumpa	Vytlačování 250 μ l Rychlost 5 μ l/s
Odstranění kuliček po analýze	Pumpa Pumpa	Aspirace 150 μ l Rychlost 150 μ l/s
Vyprázdnění zásobníku pumpy	Port 1	Vyprázdnění – Empty

4.4. Výběr elučního činidla

Při výběru elučního činidla se vycházelo z práce prováděné na naší fakultě, ve které byl amilorid stanovován v moči pomocí metody SIA-SPE [20]. V této práci využívali jako eluční činidlo roztok 0,1 M KCl + 0,01 M HNO₃. Optimalizace elučního činidla byla zkoumána na roztoku amiloridu ve vodě o koncentraci 5 µg/ml, objem 300 µl. Byl použit stejný program, jako u ostatních analýz ve vodě.

Hodnoty koncentrace KCl byly testovány v rozmezí 0,01 – 0,1 M s téměř žádným rozdílem v odezvách, nakonec byla zvolena koncentrace 0,05 M, která se jevila jako dostatečná. Tato koncentrace se již neměnila.

Koncentrace HNO₃ 0,01 M se v systému ukázala jako nedostatečná. Proto bylo testováno několik roztoků HNO₃ o zvyšující se koncentraci v rozmezí 0,02 M – 0,1 M. Až teprve hodnoty od 0,05 M se ukázaly jako použitelné (odezva okolo 1200 mV). Pro testování amiloridu ve vodě byla nakonec zvolena koncentrace 0,075 M (hodnota pH = 1,1).

Toto pH se v pozdějším testování na biologickém vzorku ukázalo jako nedostatečné (odezva okolo 800 mV). Proto bylo testováno další zvýšení koncentrace HNO₃. Testováním jsme se dostali na koncentraci 0,25 M HNO₃ (pH = 0,6). Tato koncentrace elučního roztoku již vykazovala podobnou odezvu jako při testování ve vodě (okolo 1400 mV), proto byla použita při konečném stanovení kalibrační křivky amiloridu v moči.

4.5. Kalibrační křivka roztoku amiloridu

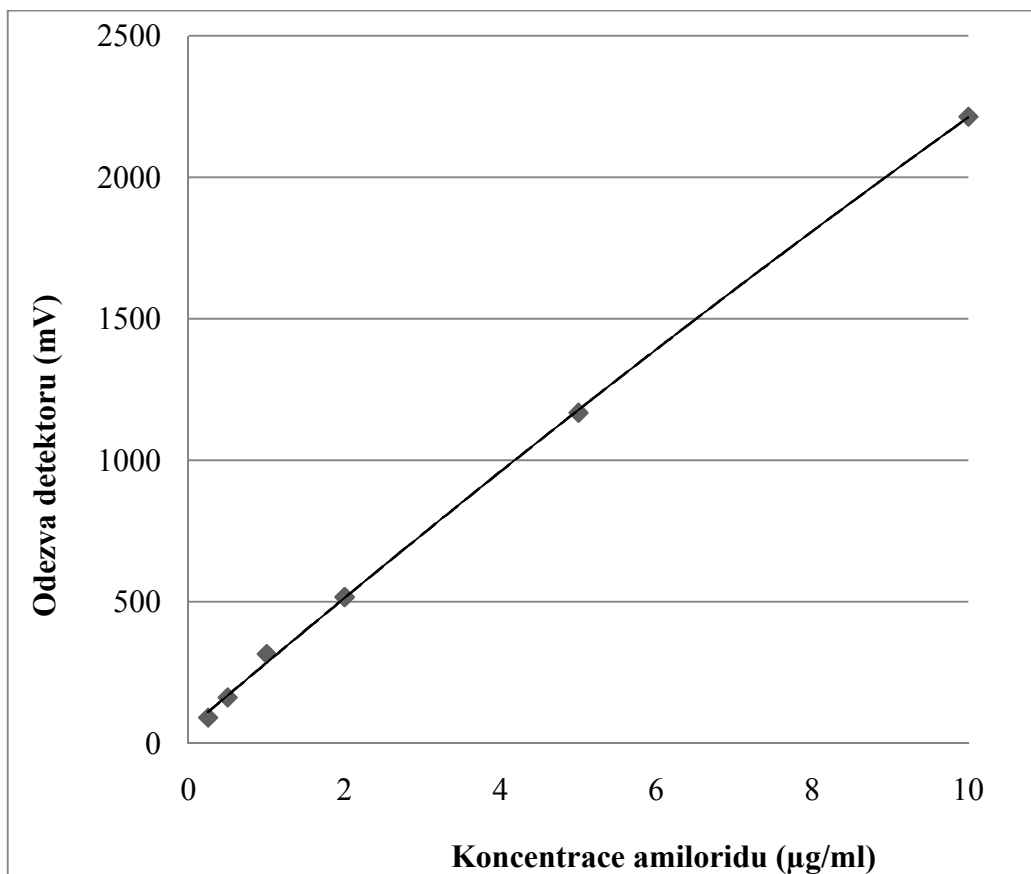
Linearitu metody shrnuje kalibrační křivka amiloridu ve vodě. Hodnoty odezvy byly měřeny pro jednotlivé koncentrace amiloridu mezi 0,25 µg/ml – 30 µg/ml. Roztoky vzorku byly připraveny naředěním vodou R ze zásobního roztoku amiloridu o koncentraci 100 µg/ml. K analýze bylo použito 300 µl vzorku a eluovalo se roztokem elučního činidla 0,075 M HNO₃ a 0,05 M KCl. Všechny koncentrace byly změřeny třikrát a do grafu byl vnesen průměr všech měření.

Linearitu nám určuje korelační koeficient křivky, v našem případě pro hodnoty 0,25 µg/ml – 30 µg/ml byla pro křivku $y = 131,5x + 310,9$ hodnota korelačního koeficientu 0,9764, což pro lineárnost nestačí, Lékopis předepisuje minimálně 0,99. Pokud budou ovšem hodnoty vztaženy pouze na koncentraci v rozsahu 0,25 µg/ml – 10 µg/ml, metoda již podmínky linearity splní. Můžeme tedy říct, že metoda je lineární v tomto rozsahu koncentrací (viz. Tabulka 3).

Pokud by měla být vyjádřena kalibrační křivka v plném rozsahu, musí být popsána polynomickou funkcí (viz. Tabulka 4).

Tabulka 2 – data pro kalibrační křivku roztoku amiloridu

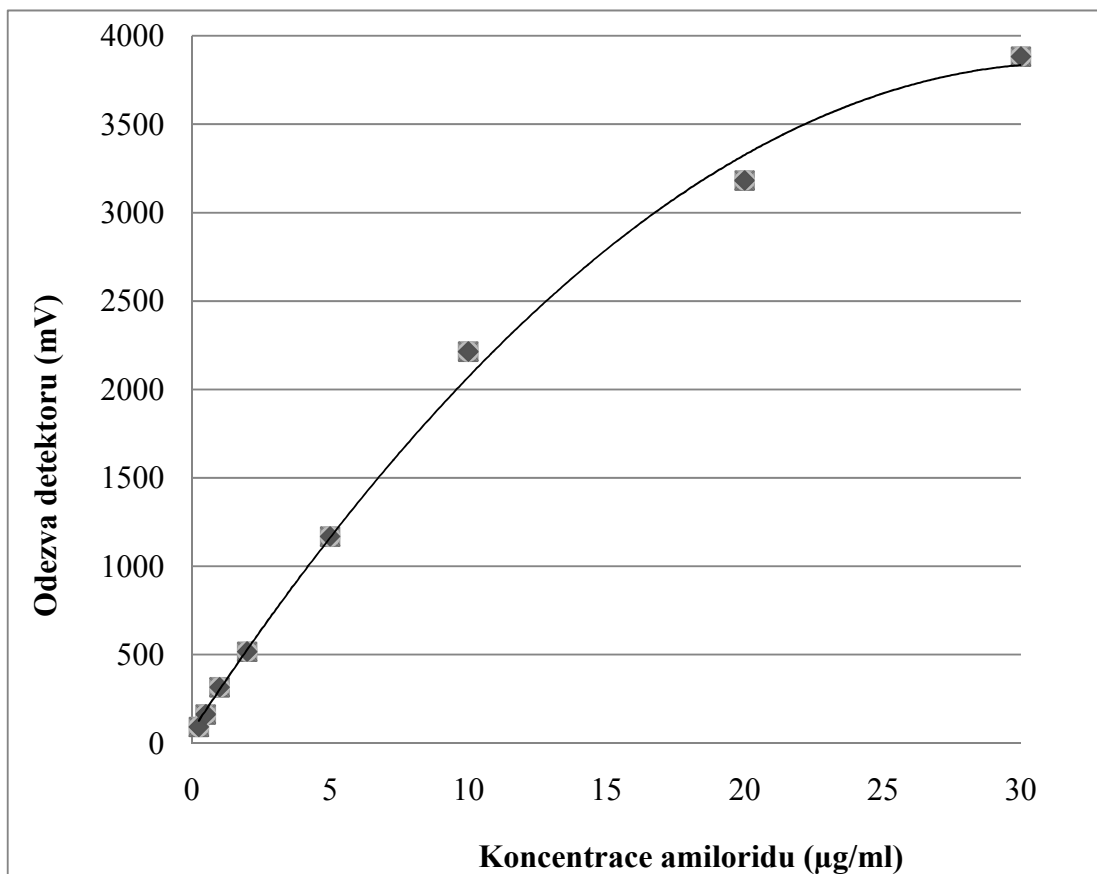
Koncentrace (µg/ml)	Odezva detektoru (mV)
0,25	91,03
0,50	162,33
1,00	315,70
2,00	516,80
5,00	1168,17
10,00	2214,13
20,00	3181,96
30,00	3882,951



Obr. 19 – kalibrační křivka pro roztok amiloridu v lineární části 0,25 - 10,00 µg/ml

Tabulka 3 – statistické parametry pro kalibrační křivku amiloridu; c = 0,25 - 10,00 µg/ml

Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$		
Počet bodů	n =	6
Směrnice	k =	215,74 ± 3,2390
Abs. člen	q =	70,52 ± 15,0948
Korelační koef.	r =	0,9995
Reziduální odch.	s =	27,43



Obr. 20 – polynomická kalibrační křivka pro roztok amiloridu v rozmezí 0,25 – 30,00 µg/ml

Tabulka 4 - statistické parametry pro polynomickou kalibrační křivku amiloridu;
c = 0,25 - 30,00 µg/ml

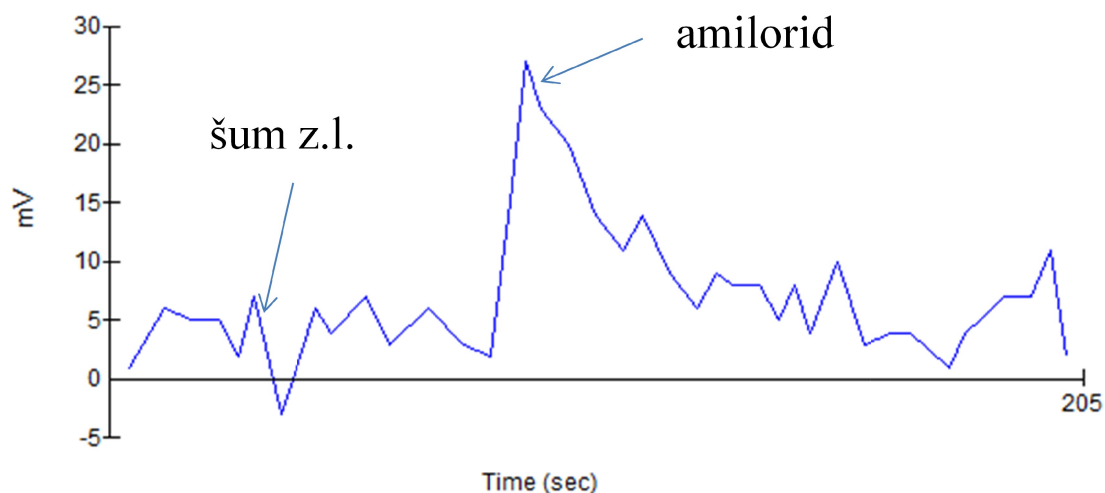
Statistické parametry pro polynomickou rovnici: $y = ax^2+bx+c$		
Počet bodů	n =	8
Koeficient x^2	a =	- 3,735 ± 0,4385
Koeficient x^1	b =	237,60 ± 12,89
Koeficient x^0	c =	67,16 ± 52,69
Korelační koef.	r =	0,9985

4.6. Stanovení limitu detekce a kvantifikace

Ke stanovení limitu detekce bylo odměřováno vždy 300 μl vzorku a eluovalo se roztokem elučního činidla o koncentraci 0,075 M HNO_3 a 0,05 M KCl . Vzorky byly připravovány postupným ředěním ze zásobního roztoku amiloridu (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Nejnižší detekovatelná koncentrace se ustálila na 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$, kdy byl pík odezvy dostatečně vysoký a představoval asi trojnásobek šumu základní linie.

Limit kvantifikace byl vypočten jako trojnásobek limitu detekce, tudíž představoval hodnotu 0,15 $\mu\text{g}/\text{ml}$.



Obr. 21 – záznam stanovení limitu detekce amiloridu ($c = 0,05 \mu\text{g}/\text{ml}$)

4.7. Opakovatelnost

Při stanovení opakovatelnosti byly měřeny série roztoků amiloridu ve vodě R o třech různých koncentracích (1,0 µg/ml; 5,0 µg/ml a 20,0 µg/ml). Roztoky byly připraveny podle návodu v kapitole o přípravě vzorků. U každé koncentrace bylo v sérii měřeno pět nástřiků vzorku. K analýze bylo spotřebováno 300 µl vzorku a eluovalo se roztokem elučního činidla 0,075 M HNO₃ a 0,05 M KCl.

Z výsledků měření byly vypočteny hodnoty směrodatných odchylek (SD) a relativních směrodatných odchylek (RSD) pro jednotlivé koncentrace. Páté měření u vzorku o koncentraci 1,0 µg/ml do výpočtů nebylo zahrnuto, protože se jednalo o zřejmou chybu měření. Hodnoty jsou shrnuty v Tabulka 5.

$$RSD_{\%} = \frac{100}{\bar{y}} \sqrt{\frac{(y_i - \bar{y})^2}{n - 1}}$$

Tabulka 5 – výsledky měření opakovatelnosti metody stanovení amiloridu

č. měření	Koncentrace (µg/ml)		
	1,0	5,0	20,0
1	317,00	1197,65	3267,46
2	283,16	1298,06	3309,06
3	296,49	1283,22	2997,61
4	368,00	1342,81	3097,66
5	205,49	1041,10	2715,36
Průměr	316,35	1232,57	3077,43
SD	32,27	106,66	213,37
RSD (%)	10,20	8,65	6,93

4.8. Analýza v moči

Aby se metoda co nejvíce přiblížila situaci při analýze v reálném vzorku, musela být vyzkoušena v biologickém materiálu, a protože amilorid se z velké části vylučuje močí nezměněn, byla přizpůsobena právě této situaci. Vzorky byly připravovány způsobem popsaným v kapitole o přípravě vzorů v moči. Moč byla používána reálná, první ranní, střední proud, odebraná v den analýzy.

4.8.1. Vliv ředění moči na odezvu detektoru

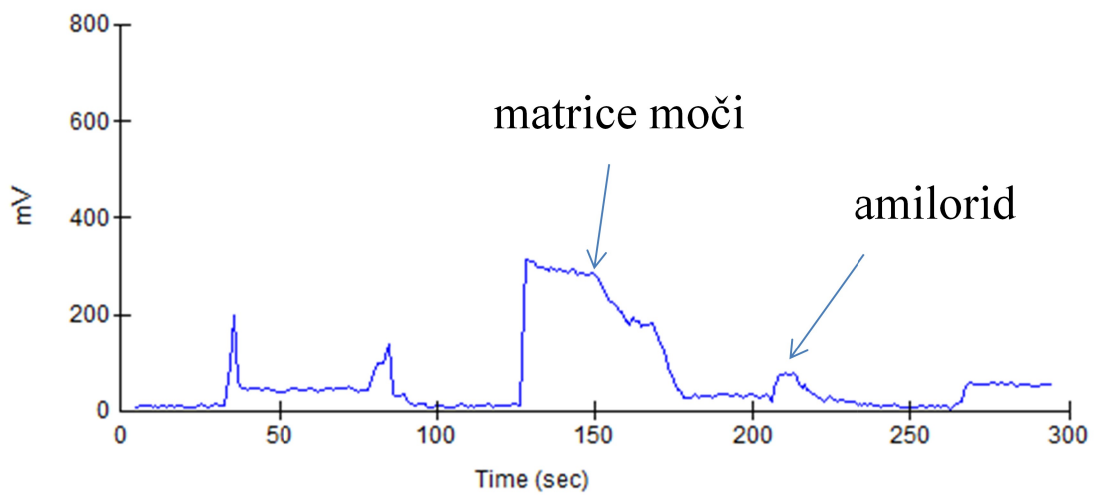
Hned po prvním testu plné moče naspikovaném vzorkem amiloridu se ukázalo, že se podařilo eluovat pouze malé množství zachyceného amiloridu (viz. Obr. 22 – testování vlivu ředění moči na odezvu – plná moč s amiloridem 5 µg/ml).

Byl použit stejný program i eluční činidlo (0,075 M HNO₃ + 0,05 M KCl) jako u předchozích analýz amiloridu ve vodě. Objem vzorku byl nastaven konstantně na 300 µl o koncentraci 5 µg/ml.

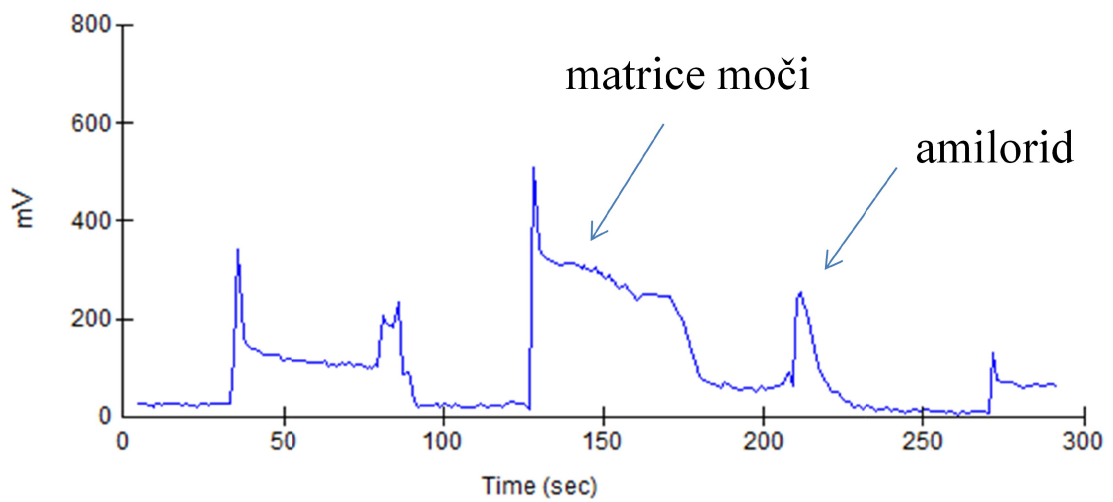
Ve snaze o optimalizaci metody bylo potřeba přistoupit k testování různého naředění biologického materiálu, v tomto případě moči, za pomoci destilované vody. Vycházelo se z již dříve vyzkoušené metody spojení SPE se systémem SIA, kde byla využita moč zředěná 1:10 [20]. Byly zkoušeny dvě různá ředění 1:1 a 1:10, větší zředění by nebylo výhodné vzhledem ke snížení koncentrace amiloridu ve vzorku, což by v reálných podmínkách bylo nevyužitelné. Ostatní podmínky zůstaly nezměněny.

Výsledky shrnuje Tabulka 7, je zřejmé, že naředění zlepšuje i schopnost detekce, takže pro další testování bylo využito ředění 1:10 i za cenu snížení koncentrace amiloridu ve vzorcích.

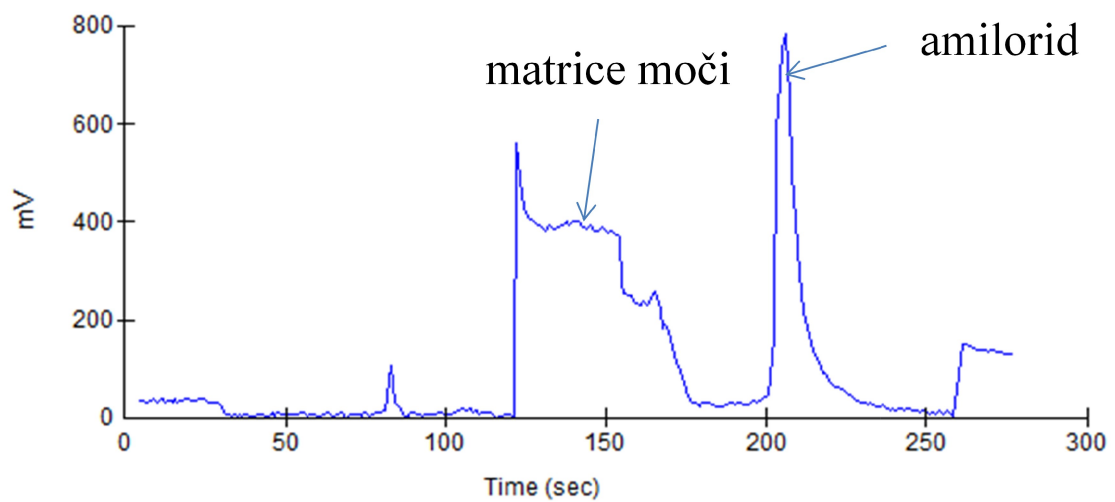
Na posledním obrázku (Obr. 25) je pro ilustraci vidět nástřík samotné zředěné moči 1:10 s vodou, kde je vidět, v porovnání s ostatními grafy, že kuličky z moči nezachycují žádný metabolit, který by po eluci interferoval se stanovovaným léčivem.



Obr. 22 – testování vlivu ředění moči na odezvu – plná moč s amiloridem 5 $\mu\text{g/ml}$



Obr. 23 - testování vlivu ředění moči na odezvu – moč zředěná vodou 1:1 s amiloridem 5 $\mu\text{g/ml}$



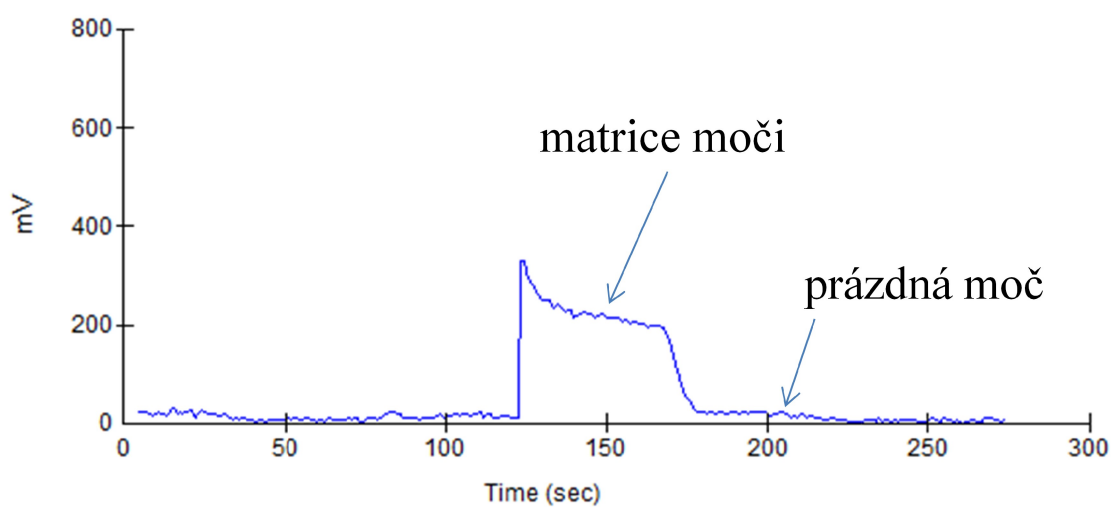
Obr. 24 - testování vlivu ředění moči na odezvu – moč zředěná vodou 1:10 s amiloridem 5 $\mu\text{g/ml}$

Tabulka 6 – popis přípravy vzorku pro zkoušení vlivu ředění moči na odezvu

Výsledný roztok o koncentraci 5 µg/ml	Počet dílů		
	Zásobní roztok Am; c = 100 µg/ml	Moč	Voda
neředěný	1	9	0
ředěný 1:1	1	9,5	9,5
ředěný 1:10	1	1,9	17,1

Tabulka 7 – výsledky zkoušení vlivu ředění moči na odezvu

Ředění moči	Odezva (mV)
plná	75
ředěná 1:1	255
ředěná 1:10	800



Obr. 25 – samotná moč zředěná 1:10 vodou

4.8.2. Testování opakovaného nástřiku vzorku na stejné kuličky

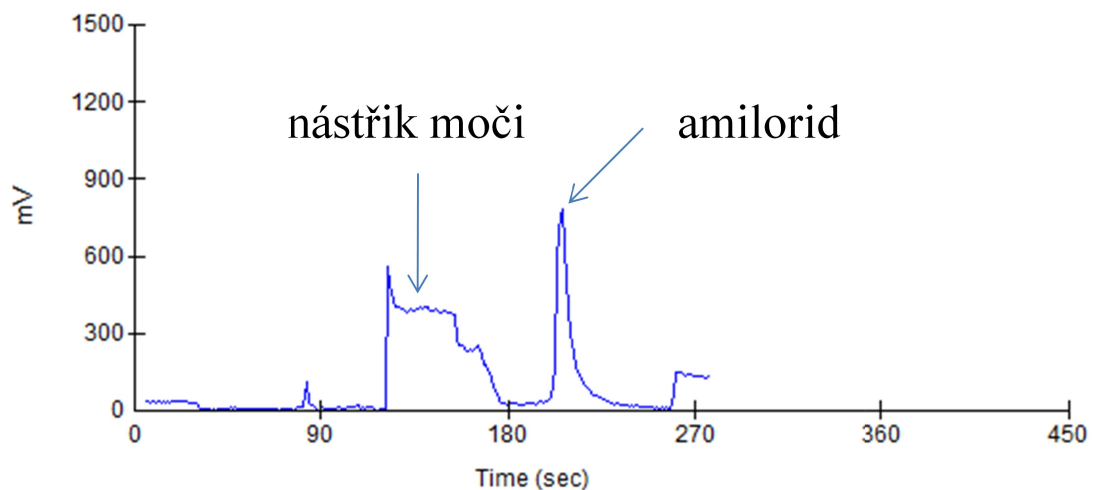
Protože se odezva zdála nedostatečná, byl proveden pokus o zakoncentrování amiloridu na kuličkách za pomoci opakovaného nástřiku a jeho následnou eluci.

Byly testovány postupně dva a potom tři nástřiky vzorku, v obou případech byla do programu přidána sekvence nasávání a nástřik stejného objemu vzorku jako u jednotlivého nástřiku u jiných analýz (tj. dvakrát 300 μ l a třikrát 300 μ l). Roztok amiloridu měl koncentraci 5 μ g/ml a byl smísen v moči 1:10 s vodou, připravenou podle postupu v kapitole o přípravě vzorku v moči. Eluce probíhala roztokem 0,075 M HNO₃ a 0,05 M KCl.

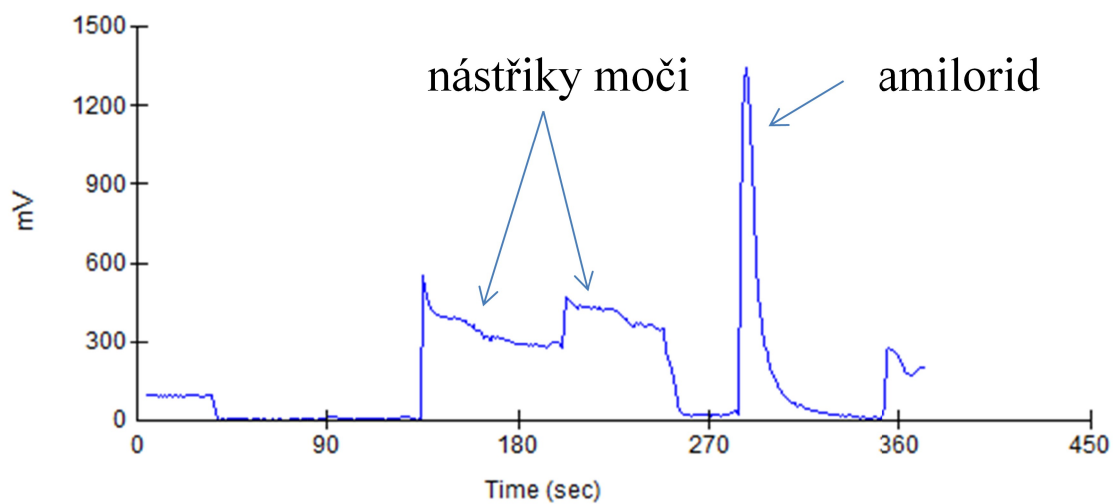
Odezva se v obou případech pohybovala kolem 1350 mV, a protože se jednalo o opakovaný nástřik stejného vzorku, dalo se předpokládat, že odezva bude nejméně dvakrát až třikrát větší, než u jednotlivého nástřiku (800 mV), bohužel se teorie nepotvrdila a nakonec se pro další analýzu zůstalo u jednoho nástřiku vzorku. To se jeví výhodně i vzhledem k časové náročnosti opakovaných nástřiků (prodloužení oproti jednomu činí 80 - 140 vteřin) a vzhledem k větší spotřebě vzorku. Výšky a časy píků shrnuje Tabulka 8.

Tabulka 8 – výsledky zkoušení opakovaného nástřiku vzorku na stejné kuličky

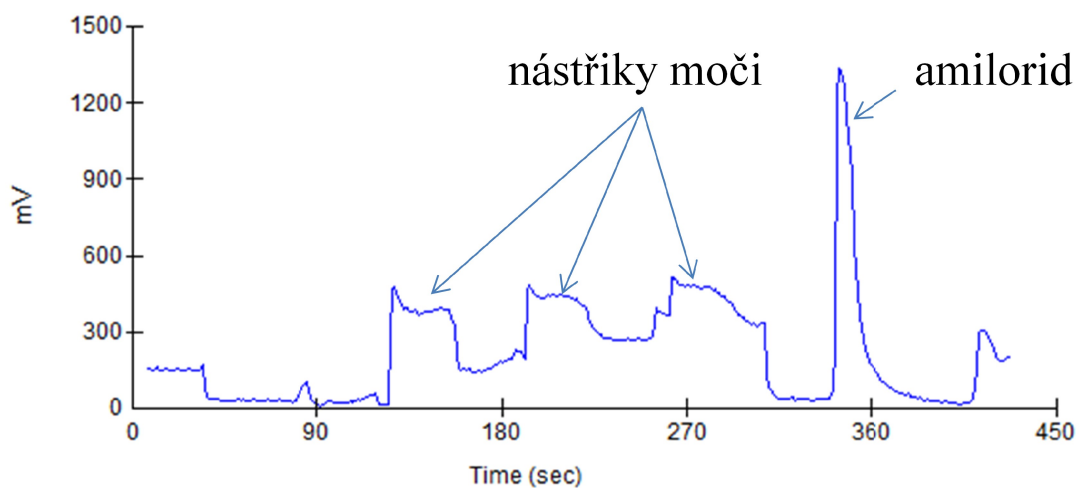
Počet nástřiků	Čas píku (s)	Odezva detektoru (mV)
1	205	800
2	285	1350
3	345	1350



Obr. 26 – testování opakovaného nástříku na stejné kuličky – jeden nástřík



Obr. 27 - testování opakovaného nástříku na stejné kuličky – dva nástříky



Obr. 28 - testování opakovaného nástříku na stejné kuličky – tři nástříky

4.8.3. Změna pH elučního činidla pro analýzu biologického vzorku

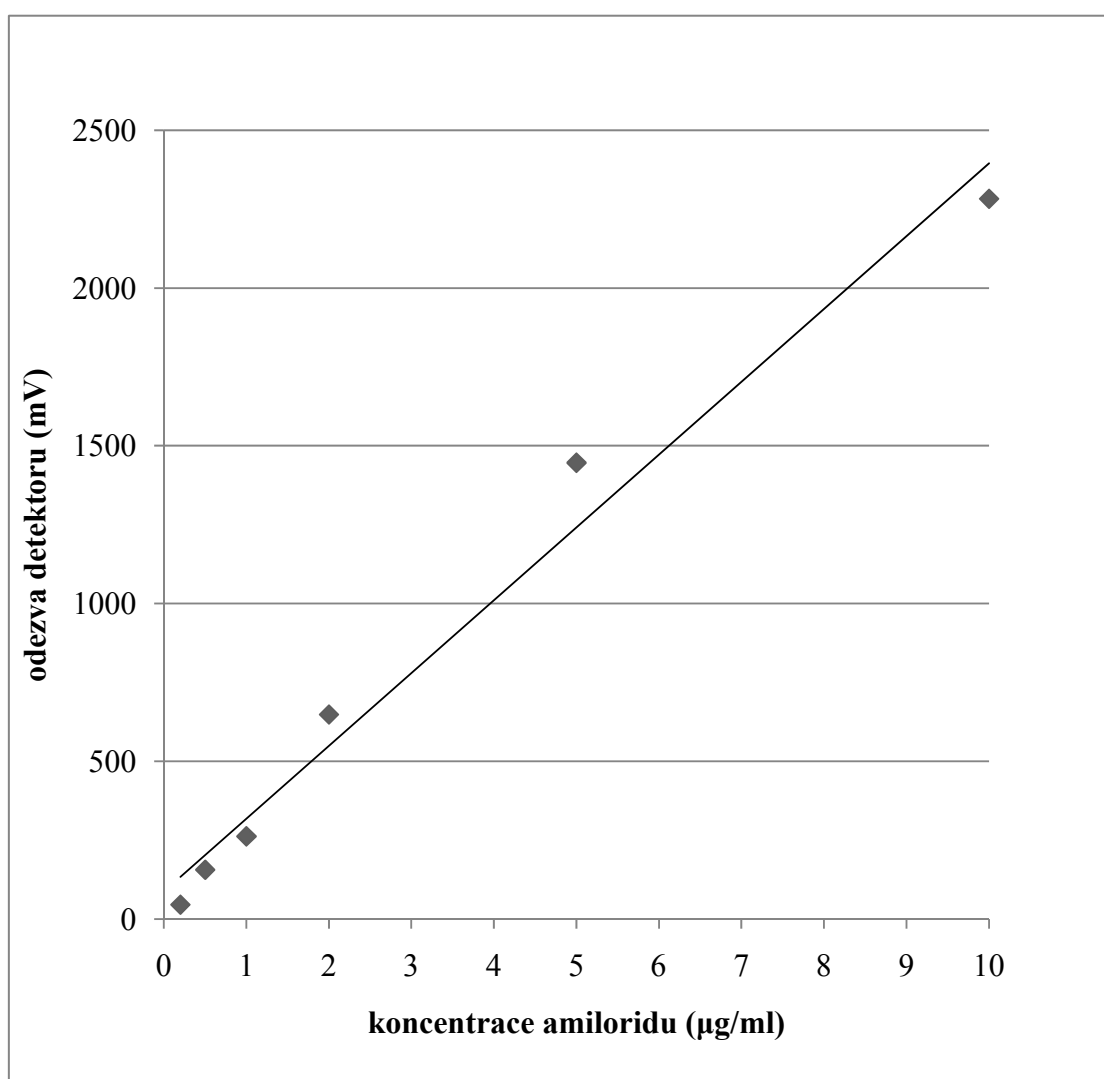
V této fázi optimalizace metody se přistoupilo k dalšímu snížení pH, protože odezvy ve vzorku moči nebyly dostatečné. Z koncentrace HNO₃ 0,075 M (pH 1,1) byla zvýšena na 0,25 M (pH 0,6), zlepšila se tím citlivost metody. Více viz. kapitola 4.4. – Výběr elučního činidla.

4.8.4. Kalibrační křivka amiloridu v moči

Výsledkem celého snažení bylo zjištění reprodukovatelné závislosti odezvy detektoru na koncentraci amiloridu ve vzorku moči.

Měření probíhalo po eluci z kuliček za pomoci elučního činidla 0,25 M HNO₃ a 0,05 M KCl. Vzorek byl připraven metodou popsanou v kapitole o přípravě vzorku v moči, bylo použito vždy 300 µl vzorku podle programu v kapitole 4.3.

Kalibrační křivku tvoří šest bodů o vzrůstající koncentraci amiloridu mezi 0,20 µg/ml - 10,00 µg/ml. Hodnota odezvy jednotlivých koncentrací je aritmetický průměr odezvy čtyř vzorků měřených v sérii.



Obr. 29 - závislost odezvy detektoru (mV) na koncentraci amiloridu (µg/ml) v naspikované moči, koncentrace amiloridu 0,2 – 10,00 µg/ml.

Tabulka 9 – data pro kalibrační křivku roztoku amiloridu v moči

Koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)	Odezva detektoru (mV)
0,20	46,25
0,50	156,43
1,00	262,67
2,00	688,50
5,00	1446,17
10,00	2282,33

Tabulka 10 - statistické parametry pro kalibrační křivku amiloridu v moči;
c = 0,20 - 10,00 $\mu\text{g/ml}$

Statistické parametry pro regresi: $y = k x + q$			
Počet bodů	n =	6	Odhad chyby
Směrnice	k =	230,66	\pm 16,4034
Abs. člen	q =	88,21	\pm 76,4387
Korelační koef.	r =	0,9900	
Reziduální odch.	s =	139,20	

Tabulka 11 – plné výsledky měření pro kalibrační křivku amiloridu v moči

č. měření	Koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)					
	0,20	0,50	1,00	2,00	5,00	10,00
1	52,00	171,00	294,00	644,00	1307,00	2246,00
2	42,00	163,30	251,00	569,00	1452,50	2340,00
3	47,00	149,00	257,00	698,00	1475,00	2384,00
4	44,00	157,00	280,00	679,00	1411,00	2123,00
Průměr	46,25	160,08	270,50	647,50	1411,38	2273,25
SD	3,77	8,09	17,36	49,29	64,49	100,05
RSD (%)	8,14	5,05	6,42	7,61	4,57	4,40

5. ZÁVĚR

Při testování chování kuliček Sephadex-CM C-25 Ion-exchange v systému LOV byl sledován především objem a rychlost kuliček, který by poskytoval jejich reprodukovatelné množství při pozdější analýze. Tyto kuličky byly drženy v rezervoáru na míchačce, která je udržovala trvale dispergované. Dospěli jsme k závěru, že je zapotřebí nejméně 200 μl 10% suspenze kuliček k jedné analýze. Rychlost nástřiku kolem 50 $\mu\text{l/s}$ zajistila dostatečně rychlé a kompletní převedení kuliček z mísící cívky do dutiny průtokové cely. K jejich odstranění bylo zapotřebí vyvinout vyšší rychlost nejméně 100 $\mu\text{l/s}$. Aby bylo množství kuliček konstantní, je vhodné hadičku mezi rezervoárem a ventilem udělat co nejkratší, aby se v ní neudržovala rezidua po předchozím nasátí. Navíc je možné hadičku před nasáváním propláchnout malým množstvím vody, tím bohužel dochází k postupnému naředění suspenze kuliček a proto je vhodné kuličky měnit přibližně po deseti měřeních.

Prací byla potvrzena možnost využití systému LOV v extrakci a následném stanovení amiloridu z lidské moči. Toho bylo docíleno díky vývinu metody bead injection pro systém LOV. Optimalizace metody spočívala ve vytvoření správného programu analýzy v počítačovém programu FIALab 5.9 for Windows. Bylo zapotřebí optimalizovat především objemy a rychlosti nástřiku, popřípadě nasátí, u jednotlivých použitých roztoků (disperze kuliček ve vodě, roztok vzorku, roztok elučního činidla). Dalším důležitým bodem optimalizace byl výběr elučního činidla, protože použitý sorbent na bázi iontovýměnné chromatografie byl citlivý na změny pH a správně pracoval až s pH pod 1. V tomto případě byl roztok měřen dokonce dvakrát (jednou při optimalizaci s vodným roztokem amiloridu, podruhé u amiloridu v moči), aby byla dosažena dostatečná citlivost metody. Při testování amiloridu v moči byl sledován vliv ředění vzorku moči na odezvu detektoru, kde se ukázalo, že vzorek by měl být desetkrát zředěný, aby byla metoda dostatečně citlivá. Možnost zakoncentrování vzorku na povrchu kuliček se ukázala jako lichá. Po stanovení optimálních vlastností metody byla provedena validace. Metoda se ukázala jako lineární v dostatečném rozmezí pro klinické využití. Citlivost byla dokonce vyšší než u porovnávané metody SIA-SPE. Relativní směrodatná odchylka byla pod 10,20 %, přičemž u vyšších koncentrací se snižovala. Čas jedné analýzy byl téměř o polovinu kratší než u SIA-SPE.

Byly stanoveny tyto optimální podmínky pro analýzu: vzorek moči desetkrát zředěný vodou R, objem vzorku k jedné analýze 300 μl , průtoková rychlost nástřiku na kuličky 10 $\mu\text{l/s}$; eluční roztok 0,25 M HNO_3 a 0,05 M KCl , pH 0,6, množství pro jednu analýzu 200 μl , průtoková rychlost 5 $\mu\text{l/s}$; kuličky sorbentu Sephadex-CM C-25 Ion-exchange, koncentrace v disperzi přibližně 10%, množství disperze k jedné analýze 300 μl , průtoková rychlost při nástřiku 50 $\mu\text{l/s}$, při odstranění ze systému 150 $\mu\text{l/s}$; fluorescenční spektrometr měřil při 272 nm.

Metoda vykazovala tyto hodnoty: limit detekce 0,05 $\mu\text{g/ml}$, limit kvantifikace 0,15 $\mu\text{g/ml}$; délka jedné analýzy 280 sekund; lineární odezva v rozmezí 0,2 – 10,00 $\mu\text{g/ml}$ při korelačním koeficientu vyšším než 0,99; při koncentracích 0,2 – 30,00 $\mu\text{g/ml}$ lze funkci popsat polynomičnou funkcí o dvou závislých proměnných při korelačním koeficientu vyšším než 0,998; opakovatelnost měření u pěti nástřiků při koncentraci 1,0 $\mu\text{g/ml}$; 5,0 $\mu\text{g/ml}$ a 20,0 $\mu\text{g/ml}$ vykazovala relativní směrodatnou odchylku pod 10,20 %.

Seznam použité literatury

1. *Český Lékopis 2009*. Praha : Grada publishing, a.s., 2009.
2. **LÜLLMANN, H., MOHR, K., WEHLING, M.** *Farmakologie a toxikologie*. Praha : Grada publishing, a.s., 2009. 80-2470836-1.
3. **PROCHÁZKOVÁ, Dana.** [Online] [Citace: 5. 5 2011.]
<http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/13080/01.pdf>.
4. **KLOUDA, PAVEL.** *Moderní analytické metody*. Ostrava : Nakladatelství Pavel Klouda, 2003. 80-86369-07-2.
5. **RUZICKA, J., HANSEN, E.H.** Flow injection analyses. *Analytica Chimica Acta*. 1975, 78.
6. **RUZICKA, J., MARSHALL, G.D.** Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Analytica Chimica Acta*. 1990, 237.
7. **RUZICKA, J.** Lab-on-valve: universal microflow analyzer based on sequential and bead injection. *The Analyst*. 2000, 125.
8. **ŠATINSKÝ, D., SOLICH, P., CHOCHOLOUŠ, P., KARLÍČEK, R.** Monolithic columns—a new concept of separation in the sequential injection technique. *Analytica Chimica Acta*. 2003, 499.
9. **RUZICKA, J., HANSEN, E.H.** *Flow injection analysis - fourth edition*. DVD : www.flowinjection.com, 2009.
10. **PASEKOVÁ, H., POLÁŠEK, M. a SOLICH, P.** Sekvenční injekční analýza. *Chemické listy*. 1999, 93.
11. **RUZICKA, J., HANSEN, ELO HARALD.** Retro-review of flow-injection analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. 2008, Sv. 27, 5.
12. **SOLICH, P., POLÁŠEK, M., KLIMUNDOVÁ, J., RUZICKA, J.** Sequential injection technique applied to pharmaceutical analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. 2003, Sv. 22, 7.
13. **LUQUE DE CASTRO, M.D., RUIZ-JIMÉNEZ, J., PÉREZ-SERRADILLA, J.A.** Lab-on-valve: a useful tool in biochemical analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. 2008, Sv. 27, 2.
14. **CHAO-HSIANG, WU, LIU, J.L.** Micro sequential injection Lab-on-valve for process monitoring and bioanalytical assays. [Online] 13. 4 2006. [Citace: 5. 5 2011.]
<http://www.flowinjection.com/brochures/caos%20paper%20on%20lov-biotech.pdf>.

15. **WANG, JIANHUA, HANSEN, ELO HARALD.** Sequential injection lab-on-valve: the third generation of flow injection analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. 2003, Sv. 22, 4.
16. **MOLINA-DÍAZ, A., GARCÍA-REYES, J.F., GILBERT-LÓPEZ, B.** Solid-phase spectroscopy from point of view of green analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*. 2010, Sv. 29, 7.
17. **MIRÓ, M., HARTWELL, S.K., JAKMUNEE, J. et al.** Recent developments in automatic solid-phase extraction with renewable surfaces exploiting flow-based approaches. *Trend in Analytical Chemistry*. 2008, Sv. 27, 9.
18. **EL-GINDY, A., EMARA, S., MOSTAFA, A.** HPLC and chemometric-assisted spectrophotometric methods for simultaneous determination of atenolol, amiloride hydrochloride and chlortalidone. *Il Farmaco*. 2005, 60.
19. **DOMÍNIGUEZ-VIDAL, A., ORTEGA-BARRALES, A., MOLINA-DÍAZ, A.** Fast flow-injection fluorimetric determination of amiloride by using a solid sensing zone. *Talanta*. 2002, 56.
20. **HUCLOVÁ, J., ŠATINSKÝ, D., PAVLÍČEK, O., VEDRALOVÁ, L., KARLÍČEK, R.** Using on-line solid phase extraction for determination of amiloride in human urine by sequential injection technique. *Analytica Chimica Acta*. 2006, 573-574.
21. **TORAL, M.I., POPE, S., QUINTANILLA, S., RICHTER, P.** Simultaneous determination of amiloride and furosemide in pharmaceutical formulations by first digital derivative spectrophotometry. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002, 249.
22. **CALVO, N., MONTES, R., LASERNA, J.J.** Surface-enhanced Raman spectrometry of amiloride on colloidal silver. *Analytica Chimica Acta*. 1993, 280.
23. **HALVATZIS, S.A. et al.** Continuous-flow chemiluminometric determination of amiloride and streptomycin by oxidation with *N*-bromosuccinimide. *Analytica Chimica Acta*. 1994, 290.
24. **PULGARÍN, J.A.M., MOLINA, A.A., LÓPEZ, P.F.** Direct analysis of amiloride and triamterene mixtures by fluorescence spectrometry using partial-least squares calibration. *Analytica Chimica Acta*. 2001, 449.
25. **PERALTA, C.M., FERNÁNDEZ, L.P., MASI, A.N.** Solid phase extraction using nylon membranes with fluorescence detection as a fast and sensitive method of Amiloide and Furosemide determination in urine samples. *Microchemical Journal*. 2011, 98.
26. **SÁDECKÁ, J., POLONSKÝ, J.** Determination of some cardiovascular drugs in serum and urine by capillary isotachopheresis. *Journal of Chromatography A*. 1996, 735.

27. **MIRMOMTAZ, E., ENSAFI, A.A., SOLEIMANIAN-ZAD,S.** Determination of amiloride using a ds-DNA-modified pencil graphite electrode based on guanine and adenine signals. *Electrochimica Acta*. 2009, 54.

28. **MARTÍN, M.E., HERNÁNDEZ, O.M., JIMÉNEZ, A.I., ARIAS, J.J. , JIMENEZ, F.** Partial least-squares method of analysis by differential pulse polarography. Simultaneous determination of amiloride and hydrochlorthiazide in pharmaceutical preparations. *Analytica Chimica Acta*. 1999, 381.