

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie



# FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

## Univerzita Karlova

Vývoj citlivého stanovení diklofenaku s využitím  
fluorescenčních vlastností komplexů s cyklodextriny

**Diplomová práce**

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Hradec Králové 2024

Ivana Pekařová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval(a) samostatně (pod vedením konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal(a), jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 2024

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí diplomové práce a to doc. PharmDr. Haně Sklenářové, Ph.D. za vstřícné vedení, odborné korekce, užitečné rady, ochotu a čas, který věnovala při vzniku mé práce. Také bych poděkovala i ostatním pracovníkům Katedry analytické chemie za vytvoření vhodných podmínek pro mé experimentální bádání. Ovšem moje poděkování náleží mé rodině, která při mém studiu a tvorbě diplomové práce stála a podporovala mě.

# Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Ivana Pekařová

Školitel: doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Název diplomové práce: Vývoj citlivého stanovení diklofenaku s využitím fluorescenčních vlastností komplexů s cyklodextriny

Tato experimentální diplomová práce se zabývá vývojem citlivého stanovení s využitím tvorby a detekce komplexu skládajícího se z aktivní látky a cyklodextrinu (CD) za využití sekvenční injekční analýzy (SIA). K následné detekci byl využíván spektrofluorimetr. Testovanou biologicky aktivní látkou byl diklofenak ve formě sodné soli.

Byly nalezeny podmínky nastavení spektrofluorimetru a to vhodná excitační a emisní vlnová délka, které byly 364,5 a 290 nm, velikost štěrbin a citlivost detekce. Poté byl výběrem ze 13 CD nalezen vhodný typ a poměr CD s diklofenakem tak, aby se měřená intenzita fluorescence lišila od intenzity samotného CD. Toto testování rozdělilo CD do 4 skupin. Při testování stability vybraných komplexů byl sledován nárůst nebo pokles intenzity fluorescence v čase pro zajištění tvorby komplexů s CD.

Pro automatizaci stanovení byla využita SIA, která byla propojena s fluorimetrickým detektorem. Pro měření v průtokovém systému bylo dále upraveno nastavení spektrofluorimetru a naprogramováno 5 ovládacích programů SIA systému, které využívaly různé mísení dvou aspirovaných zón, zastavení těchto zón v mísící cívce a kombinaci obou postupů. Při optimalizaci byla také testována různá průtoková rychlost promísení, která byla optimální při 30  $\mu\text{l/s}$ .

Pro kalibrační závislost byl z ovládacích programů vybrán program kombinující promísení aspirovaných zón změnou směru toku nosného proudu a zastavení v mísící cívce a z CD byl vybrán (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD. Nejprve bylo provedeno měření ve vodném prostředí a následně v kultivačním médiu. Pro nalezení lineární závislosti byly testovány různé koncentrace CD  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$  a  $1 \times 10^{-4}$  mol/l. Nejvyšší linearita ve vodném prostředí byla prokázána pro rozsah  $2,5 \times 10^{-7}$ – $7,5 \times 10^{-6}$  mol/l diklofenaku s  $1 \times 10^{-4}$  mol/l CD a determinačním koeficientem  $R^2 = 0,9954$ . Pro kalibraci v kultivačním médiu proto byly navrženy podmínky: Koncentrace CD byla  $1 \times 10^{-4}$  mol/l, rozsah diklofenaku  $2,5 \times 10^{-7}$ – $1 \times 10^{-5}$  mol/l. Poměr

aspirovaných zón byl 1:1 s průtokovou rychlostí 30  $\mu$ l. Využit byl ovládací program 5 s dobou zastavení v mísící cívce 1 min.

# Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of analytical chemistry

Candidate: Ivana Pekařová

Supervisor: doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Development of sensitive determination of diclofenac using fluorescent properties of complexes with cyclodextrins

This experimental thesis deals with the development of a sensitive determination using the formation and detection of a complex consisting of an active substance and cyclodextrin (CD) using sequential injection analysis (SIA). A spectrofluorometer was used for subsequent detection. The tested biologically active substance was diclofenac in the form of sodium salt.

In the beginning the conditions for setting the spectrofluorometer, namely the appropriate excitation and emission wavelengths, which were 364,5 and 290 nm, slit size and detection sensitivity were found. After that, 13 CDs were used in order to find the appropriate type and ratio of CD with diclofenac so that the measured fluorescence intensity differs from the intensity of CD alone. This testing divided the CDs into 4 groups. When testing the stability of selected complexes, the increase or decrease in fluorescence intensity over time was monitored to ensure the formation of complexes with CD.

SIA was used to automate the determination, which was connected to a fluorometric detector. For measurements in the flow system, the spectrofluorometer settings were further adjusted and 5 control programs of the SIA system were programmed, which used different mixing of the two aspirated zones, stopping these zones in the mixing coil and a combination of both procedures. During the optimization, different flow rates were also tested, and 30  $\mu\text{l/s}$  was optimal.

For the calibration, a program combining mixing of the aspirated zones by changing the direction of the carrier flow and stopping in the mixing coil was selected from the control programs, and (2-hydroxypropyl)- was selected from the CD $\gamma$ -CD. First, the measurement was carried out in an aqueous environment and then in a culture medium. To find a linear dependence, different concentrations of CD  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$  and  $1 \times 10^{-4}$  mol/l were tested. The highest linearity in the aqueous environment was demonstrated for the range of  $2,5 \times 10^{-7}$ – $7,5 \times 10^{-6}$  mol/l diclofenac with  $1 \times 10^{-4}$  mol/l CD and the

coefficient of determination  $R^2 = 0,9954$ . Therefore, the following conditions were proposed for calibration in the culture medium: CD concentration was  $1 \times 10^{-4}$  mol/l, diclofenac range  $2,5 \times 10^{-7}$ – $1 \times 10^{-6}$  mol/l. The aspirated zone ratio was 1:1 with a flow rate of 30  $\mu$ l. Control program 5 was used with a stop time in the mixing coil of 1 min.

## Obsah

Abstrakt .....	4
Abstract .....	6
1. Úvod .....	11
2. Cíl a popis zadání práce .....	12
3. Teoretická část .....	13
3.1. Diklofenak sodná sůl .....	13
3.1.1. Fyzikálně – chemické vlastnosti .....	13
3.1.2. Farmakologická charakteristika .....	13
3.2. Cyklodextriny .....	14
3.2.1. Komplex CD s DCF .....	15
3.3. Spektrofluorimetrie .....	18
3.3.1. Charakteristika spektrofluorimetrie a fluorescenčních spekter .....	18
3.3.2. Instrumentace – spektrofluorimetr .....	19
3.3.3. Využití spektrofluorimetrie .....	21
3.4. Průtokové neseparační analytické techniky .....	21
3.5. Sekvenční injekční analýza .....	23
3.5.1. Princip SIA .....	23
3.5.2. Přístrojové vybavení používané v SIA .....	24
3.5.3. Využití SIA systému .....	25
3.5.4. Ovládací program SIA .....	26
4. Experimentální část .....	28
4.1. Použité přístroje .....	28
4.2. Použité chemikálie .....	28
4.3. Příprava roztoků .....	29
4.4. Experimentální podmínky luminiscenčního stanovení DCF .....	30
4.4.1. Spektrofluorimetr .....	30
4.4.2. SIA .....	33
4.5. Měření kalibrační závislosti ve vodě .....	37
4.6. Měření kalibrační závislosti s kultivačním médiem .....	39
5. Výsledky a diskuse .....	40
5.1. Předběžné testování luminiscenčních vlastností komplexů CD : DCF .....	40
5.2. Výběr CD za použití manuálně plněné květy .....	43
5.3. Stabilita vybraných komplexů CD s DCF .....	46
5.4. Podmínky měření v SIA systému .....	49
5.4.1. „Accumulation time“ .....	49



5.4.2. Průtoková rychlost.....	50
5.4.3. SIA ovládací programy pro různé CD .....	51
5.4.4. Měření po 24 hod .....	58
5.4.5. Měření při zastavení toku v mísící cívce .....	58
5.5. Kalibrační závislost.....	61
5.5.1. Měření kalibrační závislosti ve vodě .....	61
5.5.2 Měření kalibrační závislosti s kultivačním médiem .....	68
6. Diskuse.....	71
7. Závěr .....	73
8. Seznam použité literatury.....	74
9. Přílohy.....	78
9.1. Příloha č. 1: Ovládací program 1.....	78
9.2. Příloha č. 2: Ovládací program 2.....	78
9.3. Příloha č. 3: Ovládací program 3.....	79
9.4. Příloha č. 4: Ovládací program 4.....	80
9.5. Příloha č. 5: Ovládací program 5.....	81
10. Seznam obrázků.....	83
11. Seznam tabulek .....	85

### Seznam použitých zkratek

c	koncentrace
CD	cyklodextrin
CFA	Kontinuální průtoková analýza (Continuous flow analysis)
DCF	diklofenak (ve formě sodné soli)
EM	emisní spektrum/vlnová délka (nm)
EX	excitační spektrum/vlnová délka (nm)
FL	fluorescence
FIA	Průtoková injekční analýza (Flow injection analysis)
m	hmotnost (g)
M	molární koncentrace (mol/l)
Mr	molární hmotnost (g/mol)
NSAID	nesteroidní protizánětlivé léčivo = nesteroidní antiflogistikum (non-steroidal anti-inflammatory drugs)
SFA	Segmentovaná průtoková analýza (Segmented flow analysis)
SIA	Sekvenční injekční analýza (Sequential injection analysis)
UV	ultrafialová oblast spektra
V	objem (ml)
VIS	viditelná oblast spektra

# 1. Úvod

Tato diplomová práce je založena na vývoji stanovení velmi nízkých koncentrací diklofenaku na základě tvorby komplexu s cyklodextriny. Výhodou tohoto stanovení je vysoká citlivost a selektivita, které jsou potřeba pro analýzu nízkých koncentrací v komplexní matrici, např. biologických vzorků.

V současnosti jsou nároky na citlivost analytických technik vysoké, používají se vysoce citlivé a selektivní techniky nebo je potřeba provést složitější úpravu vzorku, která pomůže cílové analyty zakonzentrovat a odstranit rušivý vliv matrice vzorku (např.: precipitace proteinů, Liquid-liquid extraction, Solid-phase extraction, ...). Bez těchto postupů v dnešní době neobejde mnoho odvětví nejen na výzkumném poli, ale co se týče běžného života (kontrola potravin, životního prostředí, hygienická kontrola, ...).

V diplomové práci je popsán vývoj spektrofluorimetrického stanovení v SIA systému, které má v budoucnu sloužit pro automatizované stanovení diklofenaku v metabolických studiích.

## 2. Cíl a popis zadání práce

Cílem této diplomové práce je experimentálně využít tvorbu komplexu CD : DCF v nízkých koncentracích, které jsou po metabolizaci DCF stále přítomny v lidském organismu, resp. ve vzorcích z metabolických studií.

DCF byl zvolen jako modelový analyt pro monitorování metabolizace léčiva v reálném čase, díky známému průběhu jeho metabolismu v lidském organismu. Pro monitorování nízkých koncentračních hladin DCF bylo nutné zvolit a optimalizovat citlivou a selektivní analytickou metodu jeho stanovení, které je dále plánováno použít pro jeho stanovení v biologickém materiálu, resp. v kultivačním médiu, pro monitorování odbourávání DCF lidskými primárními hepatocyty. Jako detekční techniky, které lze snadno spojit s monitorováním v průtokovém SIA systému, byly vytipovány fluorescence nebo chemiluminiscence. Na základě rešerše odborných článků byly nalezeny práce, které zmiňují možnost využití fluorescence komplexů DCF s CD, protože samotný DCF fluorescenci nevykazuje.

Hlavním předmětem testování bude nalezení vhodných podmínek měření (spektrofluorimetrie, SIA), zvolení vhodného CD pro tvorbu komplexu ve vhodném poměru s DCF, posouzení stability vzniklých komplexů, testování ovládacích programů SIA systému a kalibrační rozsah ve vodném prostředí následované přenesením podmínek stanovení pro testování v kultivačním médiu.

## 3. Teoretická část

### 3.1. Diklofenak sodná sůl

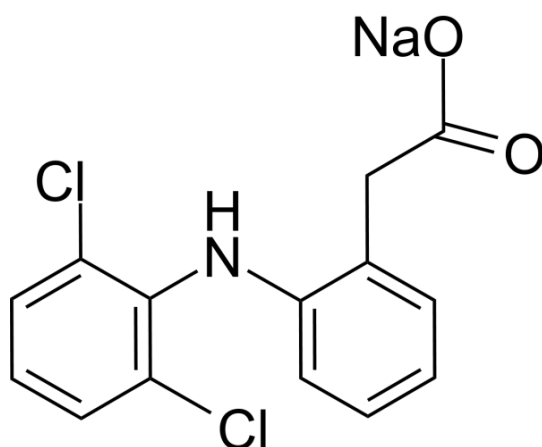
Systematický název pro diklofenak sodná sůl je natrium-{2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyl}acetát (Obrázek 1).

#### 3.1.1. Fyzikálně – chemické vlastnosti

Český lékopis popisuje sodnou sůl diklofenaku jako bílý nebo slabě nažloutlý a slabě hygroskopický krystalický prášek. Mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v methanolu, dobře rozpustný v ethanolu 96%, těžce rozpustný v acetonu [1].

Sumární vzorec sodné soli DCF je  $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$  [1].

Molekulová hmotnost sodné soli DCF je 318,13 g/mol [2][2].



Obrázek 1: Vzorec sodné soli diklofenaku [3]

#### 3.1.2. Farmakologická charakteristika

Diklofenak sodný je forma sodné soli diklofenaku, derivátu kyseliny benzenoctové a nesteroidního protizánětlivého léčiva (NSAID) s analgetickou, antipyretickou a protizánětlivou aktivitou [2].

DCF a ostatní NSAID inhibují cyklooxygenázu, enzym zodpovědný za syntézu prostaglandinů, jež jsou vytvářeny v ohnisku zánětu a jsou zdrojem lokálních projevů zánětu jako je hyperémie, otok, zvýšená teplota, bolestivost apod. [4].

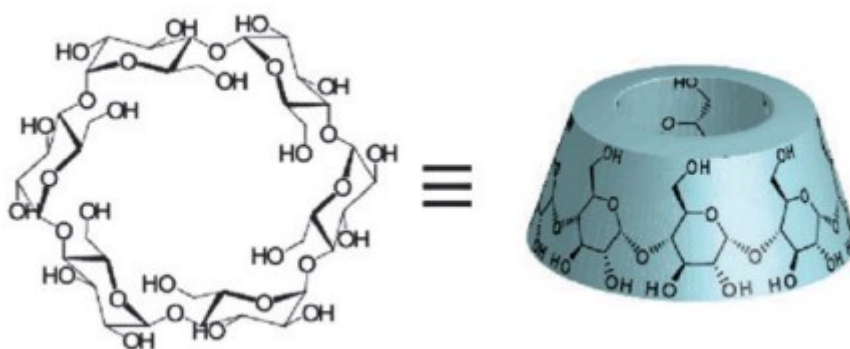
Dobře se DCF vstřebává po perorálním podání, ale téměř polovina podané látky se nesystémově eliminuje v játrech. Diklofenak je metabolizován glukuronidací na karboxylové skupině a po hydroxylaci fenolových kruhů je metabolizován konjugací. Po konjugaci jsou metabolity vylučovány stolicí (30 %) a močovými cestami (70 %). Pouze 1-5 % se vyloučí v nezměněné formě [5][6].

Používá se k léčbě osteoartritidy, revmatoidní artritidy a ankylozující spondylitidy. Díky své nízké rozpustnosti je komerčně dostupný ve formě sodné soli. Pro kvantitativní stanovení tohoto léčiva v lékových formách a v biologických vzorcích byla vyvinuta řada analytických metod. Mezi ně patří i spektrofotometrie [7].

### 3.2. Cyklodextriny

Cyklodextriny (CD) jsou ve vodě rozpustné cyklické oligosacharidy složené ze šesti ( $\alpha$ -), sedmi ( $\beta$ -) a osmi ( $\gamma$ -) jednotek D-(+)-glukopyranózy uspořádaných do struktury tvaru komolého kužele. Mají schopnost tvořit inkluzní komplex s hostujícími molekulami s vhodnou polaritou a rozměrem kvůli jejich speciální molekulární struktuře (hydrofobní vnitřní dutině a hydrofilnímu vnějšímu povrchu) [8][10].

Obrázek 2 zobrazuje strukturu  $\alpha$ -CD, je zde znázorněna i struktura komolého kužele.



Obrázek 2: Struktura  $\alpha$ -CD [11]

Tabulka 1 popisuje vlastnosti jednotlivých typů CD.

Tabulka 1: Přehled vlastností jednotlivých typů cyklodextrinů [10]

Typ CD	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Počty jednotek glukózy	6	7	8
Molekulová hmotnost (g/mol)	972	1135	1297
Vnitřní průměr (nm)	0,57	0,78	0,95
Hloubka (nm)	0,78	0,78	0,78

<b>Rozpustnost (g/100 ml vody)</b>	14,50	1,85	23,20
<b>pKa</b>	12,23	12,20	12,08

### 3.2.1. Komplex CD s DCF

Nejdůležitější vlastností inkluzní sloučeniny je, že hostitelská složka (CD) může přijmout hostovanou složku (DCF) do své dutiny, aniž by se vytvořily jakékoli kovalentní vazby. Minimálním požadavkem pro vznik inkluzního komplexu je velikostní kompatibilita mezi hostitelskými a hostujícími molekulami (host musí zcela nebo alespoň částečně zapadnout do dutiny CD) [10].

Díky tomu dojde ke změně fyzikálně-chemických vlastností léčiva (v našem případě DCF). Může dojít ke zvýšení rozpustnosti ve vodě, zvýšení jeho stability a zlepšení dodání léčiv přes biologické membrány [12].

K další zajímavým vlastnostem patří zvýšení intenzity fluorescence a indukce chirální aktivity po přidání CD. Tato vlastnost CD byla využita a bylo navrženo mnoho metod založených na fluorescenci inkluzních komplexů s CD včetně stanovení několika farmaceuticky aktivních látek, pesticidů a kovů. Výhody fluorescenční analýzy spočívají v tom, že je schopna stanovit mnohem nižší koncentrace než spektrofotometrická analýza a je potenciálně selektivnější, protože vlnové délky excitace i emise se u jednotlivých látek liší. DCF tvoří inkluzní komplex s CD nejčastěji v poměru 1:1 [9][10].

Stanovením DCF za přítomnosti CD a studiu tvorby komplexu se věnují následující práce. Tyto práce byly vyhledány pomocí databáze PubMed. Při vyhledávání byla zadávána klíčová slova: diclofenac, cyclodextrin, spektrofluorometric, determination. Při vyhledávání s výše uvedenými klíčovými slovy byly nalezeny i články, u kterých byl použit ibuprofen jako testované léčivo.

Shrnuté výsledky rešerší jsou uvedené v Tabulce 2.

V rešeršních pracích (Tabulka 2) byly použity hlavně CD typu  $\alpha$  a  $\beta$ . Poměry CD : DCF byly v nalezených pracích vždy 1:1. Koncentrace CD byly v rozsahu  $1-4 \times 10^{-2}$  mol/l, přičemž ve většině případů byla zvolena koncentrace  $1 \times 10^{-2}$  mol/l. Koncentrace DCF, které byly v těchto pracích stanovované, ležely v rozmezí  $2 \times 10^{-6} - 3 \times 10^{-4}$  mol/l. Použité excitační a emisní vlnové délky komplexů s CD byly 289 a 362 nm, pokud nebyla využita derivatizace nebo další fluorofor.

Tabulka 2: Výsledky rešerše prací zabývajících se fluorimetrickým stanovením DCF za využití CD nebo derivatizace

Chemikálie	Koncentrace (mol/l)	Poměr DCF : CD	Ředění roztoků	Úpravy	Detekce	Teplota test. roztoků (°C)	EX a EM vlnová délka (nm)	Citace
DCF sodná sůl	$5,7 \times 10^{-6}$	1:1	Destilovaná voda	Úprava pH pomocí NaOH a HClO <sub>4</sub>	Fluorimetrická	20	EX: 289	[8]
α-CD	$1 \times 10^{-2}$						EM: 362	
DCF sodná sůl	$2 \times 10^{-6}$	1:1	Destilovaná voda	Úprava pH pomocí NaOH a HClO <sub>4</sub>	Fluorimetrická	20	EX: 289	[13]
β-CD	$1 \times 10^{-2}$						EM: 362	
DCF sodná sůl	$3 \times 10^{-4}$	1:1	Deionizovaná a destilovaná voda	Pyren ( $1 \times 10^{-3}$ mol/l) jako fluorofor	Fluorimetrická	25	EX: 340	[14]
α/β/γ-CD	$0-4 \times 10^{-2}$						EM: 350–450	
ibuprofen	Tablety	1:1	Destilovaná voda	Úprava pH pomocí NaOH	Fluorimetrická	$20 \pm 0,1$	EX: 226	[15]
β-CD	$1 \times 10^{-2}$						EM: 290	
DCF	$2 (5,5) \times 10^{-6}$	1:1	Destilovaná voda	Úprava pH pomocí NaOH, HClO <sub>4</sub>	Fluorimetrická	20	EX: 289	[8],[10]
α/β-CD	$1 \times 10^{-2}$						EM: 362	
DCF (voltaren)	Tablety	1:1	Methanol	Boritanový pufr (0,1 mol/l)	Fluorimetrická	Zahřátí 30 min na 70 °C a necháno vychladnout	EX: 464	[16]
7-fluor-4-nitrobenzo-2-	0,2 mg/ml						EM: 521	



oxa-1,3-diazol (NBD-F)				Derivatizace (NBD- F)				
---------------------------	--	--	--	--------------------------	--	--	--	--

### 3.3. Spektrofluorimetrie

Spektrofluorimetrie je analytická technika, která je založená na studiu fluorescenčních spekter a jejich využití pro citlivé a selektivní stanovení analytů [17].

Fluorescence je fyzikální jev, při kterém molekuly absorbují světelné záření (nacházejí se v excitovaném stavu) určité vlnové délky. Část energie, kterou molekula přijala ve velmi krátkém čase (v řádech femtosekund) vyzáří (dojde k emisi) v podobě světla o delší vlnové délce (dojde ke snížení energie a změně vlnové délky). Posun ve vlnové délce je charakterizován jako tzv. „Stokesův“ posun [18].

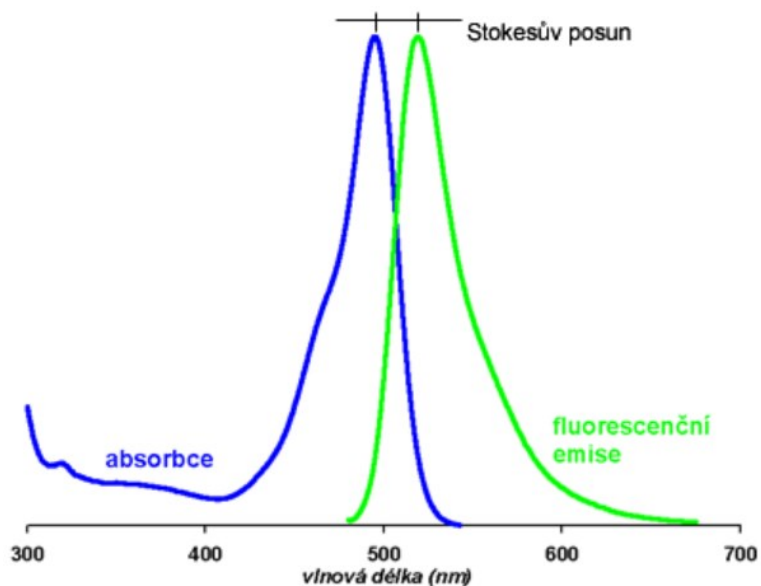
#### 3.3.1. Charakteristika spektrofluorimetrie a fluorescenčních spekter

Excitační spektrum vyjadřuje závislost intenzity fluorescence na vlnové délce budícího záření s konstantní intenzitou. Maximum excitace odpovídá vlnové délce, která způsobuje maximální fluorescenci [19].

Emisní spektrum vyjadřuje závislost intenzity fluorescence na vlnové délce emisního (sekundárního) záření při konstantních podmínkách excitace [19].

Stokesův posun vyjadřuje, že vlnová délka excitačního záření je nižší než vlnová délka emisního záření (analogicky k porovnání jejich energie  $E_{ex} > E_{em}$ ) [17]. Energie emise je typicky výrazně menší než energie excitace. Proto fluorescence vykazuje menší energie (Stokesův posun) a větší vlnové délky (Anti-Stokesův posun). Tento jev byl poprvé pozorován Sir. G. G. Stokesem v roce 1852 [20], později byl tento jev nazván jako tzv. Stokesův posun.

Obrázek 3 zobrazuje excitační (absorpční) a emisní spektrum fluorescein 5-isokyanátu. Kdy rozdíl maxim obou spekter odpovídá Stokesovu posunu.



Obrázek 3: Absorpční a emisní spektrum fluorescein 5-isokyanátu [18]

K hlavním charakteristikám fluorescence patří [21]:

Intenzita – počet fotonů procházejících v daném směru jednotkovou plochou za jednotku času

Spektrální složení – spektrální hustota fotonového toku na jednotkový interval vlnových délek nebo frekvencí

Polarizace – směr kmitání elektrického vektoru elektromagnetické vlny

Doba dohasínání – je dána vnitřní dobou života excitovaného stavu, z něhož dochází k emisi; úzce souvisí s pochody vedoucími k nežádoucí deaktivaci tohoto stavu

Koherenční vlastnosti – vztahy mezi fázemi světelných vln

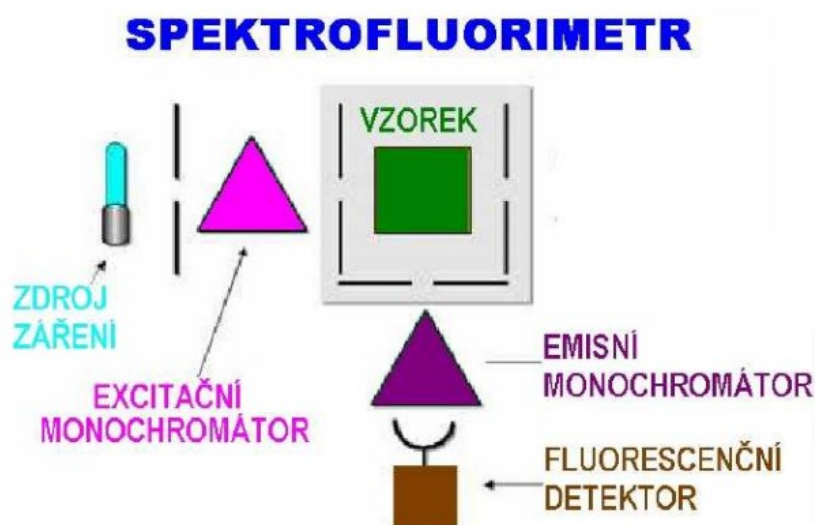
### 3.3.2. Instrumentace – spektrofluorimetr

Analytické metody (měřící fotoluminiscenci) jsou zaměřené na vyhodnocení interakce excitačního záření s analyzovanou látkou [21].

Nejvíce se uplatnily spektrofluorimetry (další možností jsou fluorimetry). Pro měření emisního a excitačního záření se využívá přístroj spektrofluorimetr, jehož hlavní výhodou je, že snímá záznamy obou typů spekter [19].

Ideální spektrofluorimetr (a jeho komponenty) by měly mít následující vlastnosti: Zdroj světla by měl poskytnout konstantní výstup fotonů na všech vlnových délkách. Monochromátor by měl se stejnou účinností procházet fotony všech vlnových délek. Účinnost monochromátoru by měla být nezávislá na polarizaci. Detektor by měl detekovat fotony všech vlnových délek se stejnou účinností [22].

Spektrofluorimetry s těmito ideálními vlastnostmi nejsou k dispozici a je třeba provést kompromisy ve výběru komponent a tím korigovat neideální odezvu přístroje [22]. Při analýze vzorku, který je nutno zředit vhodným rozpouštědlem, nesmí toto rozpouštědlo fluoreskovat a ani absorbovat [19]. Na Obrázku 4 jsou zobrazeny a popsány součásti spektrofluorimetru.



Obrázek 4: Popis a součásti spektrofluorimetru [19][23]

Spektrofluorimetr obsahuje intenzivní zdroj světla v UV a viditelné oblasti spektra. Jako světelné zdroje se používají vysokotlaké xenonové a rtuťové výbojky, lampy (wolfram-halogenová) a laserové diody (laser). Excitační záření (budící záření) vychází ze zdroje světla a prochází monochromátorem [17]. Monochromátory slouží k rozptýlení bílého nebo polychromatického světla do různých barev nebo vlnových délek. To může být provedeno pomocí filtrů, hranolů nebo difrakčních mřížek. Ke specifikacím monochromátoru patří rozptyl, účinnost a úroveň rozptýleného spektra. Šířky štěrbin jsou variabilní a monochromátor bude mít jak vstupní, tak výstupní štěrbinu. Šířka štěrbin se vyjadřuje v nm. Větší šířky štěrbin poskytují vyšší intenzitu signálu, ale proto i vyšší poměr signálu k šumu. Menší šířky štěrbin poskytují vyšší rozlišení látek, na úkor intenzity světla [19]. Při měření fluorescenčních emisních spekter je excitační monochromátor nastaven na pevnou vlnovou délku excitačního (budícího) zařízení a vlnové délky vycházející z emisního monochromátoru se mění. Při měření excitačních spekter je vlnová délka emisního monochromátoru pevně nastavena a plynule se mění excitační vlnová délka [24]. Dále se světelný zdroj dostává z monochromátoru do kyvetového prostoru, kde je kyveta s analyzovanou látkou a záření dopadá na vzorek. Kyvety jsou ze všech stran čiré a jsou většinou

křemenné [19]. Výsledné emitované fluorescenční záření látky (měřeného vzorku) je pod úhlem 90° snímáno přes emisní monochromátor a dopadá na detektor. K detekci se používají fotonásobiče nebo polovodičové detektory (lavinová fotodioda, array detektory) [19]. Spektrofluorimetr je ovládaný a propojený s ovládacím programem, který umožňuje záznam výsledných spekter (emisních a excitačních).

Na obrázku 5 je zobrazen spektrofluorimetr, konkrétně se jedná o Spektrofluorimetr RF 6000 (Shimadzu), který byl používán při měření.



Obrázek 5: Spektrofluorimetr RF 6000

### 3.3.3. Využití spektrofluorimetrie

Spektrofluorimetrie je v současné době využívána v celé řadě oborů zejména pro svoji citlivost a selektivitu. Uplatnění nachází od potravinářského průmyslu (kde se hodnotí kvalita potravin), přes kriminalistiku, imunochemii, farmaceutický průmysl, dokonce i medicínu. Často se citlivost a selektivita spektrofluorimetrické detekce využívá v zapojení s průtokovým systémem s kontinuálním průtokem, jako je například sekvenční injekční analýza (SIA). Dále ji můžeme využít například pro stanovení pH uvnitř buněk, zkoumání životnosti buněk, stanovení rychlosti proliferace buněk a zejména ve formě fluorescenčního značení i ve spojení s mikroskopií [25].

### 3.4. Průtokové neseparační analytické techniky

Jedná se o techniky kinetické. Jsou založeny na principu vstříkovaní definovaného objemu vzorku. Vzorek je pomocí nosného proudu unášen do detektoru. Tyto techniky využívají řízenou disperzi, čím se zajistí promísení vzorku s činidlem, což vede k vytvoření detekovatelného produktu. Tento produkt

je vyhodnocen detektorem díky signálu ve formě píku. Naměřené hodnoty se následně porovnávají a nejčastěji vyhodnocují na základě průměrné hodnoty výšek tří signálů [26].

Mezi neseparační průtokové analytické techniky patří:

Kontinuální průtoková analýza (CFA), segmentovaná průtoková analýza (SFA), průtoková injekční analýza (FIA), v této diplomové práci používaná sekvenční injekční analýza (SIA) a metoda SIA/BIA [27].

Stručně jsou jednotlivé techniky rozebrány níže [27]-[30]:

Kontinuální průtoková analýza (CFA) - U této průtokové techniky je kontinuálně dávkován nosný proud (případně činidlo) a vzorek do průtokového systému. K chemické reakci (tvorbě produktu) dochází v průtokovém systému, od prvního kontaktu vzorku a činidla. Analýza trvá poměrně dlouho, protože se čeká na kvantitativní průběh dané reakce, a je zde i vysoká spotřeba reagensů (vzorků a dalších roztoků).

Segmentovaná průtoková analýza (SFA) - Tato technika byla vyvinuta z CFA. Je založena na kontinuálním toku nosného proudu, ale jednotlivé vzorky jsou od sebe oddělené vzduchovou bublinou. Vzduchová bublinka je odstraněna, než se dostane k detektoru. Kvůli ustálení rovnováhy je zde opět dlouhá doba měření. Nevýhodou je sice nižší, ale stále vysoká spotřeba činidel.

Průtoková injekční analýza (FIA) – Je to nestacionární technika, která přináší zrychlení analýzy (nemusí se čekat na rovnováhu). Peristaltickým čerpadlem jsou do systému čerpána činidla, nosný proud (ale i pufrý a další pomocné látky nutné k reakci). Čerpadlo způsobuje pulzování, což vede ke zhoršení výsledků a k nepravidelné rychlosti toku. Vzorek je dávkován do průtokového systému injekčním ventilem. K mísení vzorku a činidel dochází při souvislém jednosměrném toku průtokovým systémem směrem k detektoru. FIA je ale výkonnější technika oproti CFA a SFA, dokáže pracovat až 120 vzorků za hodinu.

Sekvenční injekční analýza (SIA) – Je zajištěn obousměrný tok díky použití pístového čerpadla, které zaručuje bezpulzní tok nosného proudu, také zajišťuje obousměrný průtok v systému a efektivnější mísení. Selekční ventil umožňuje přesné dávkování objemů roztoků, a tedy snižuje jejich spotřebu. Celá soustava je řízena pomocí počítačového programu. Více je tato technika popsána v následující kapitole 3.5.

Miniaturizací SIA systému, vznikla technika, která se nazývá Lab-On-Valve SIA/BIA. Výhodou této modifikace je, že mohou být aspirovány malé částice pevného sorbentu a automatizován postup SPE extrakce s obnovitelným povrchem sorbentu.

## 3.5. Sekvenční injekční analýza

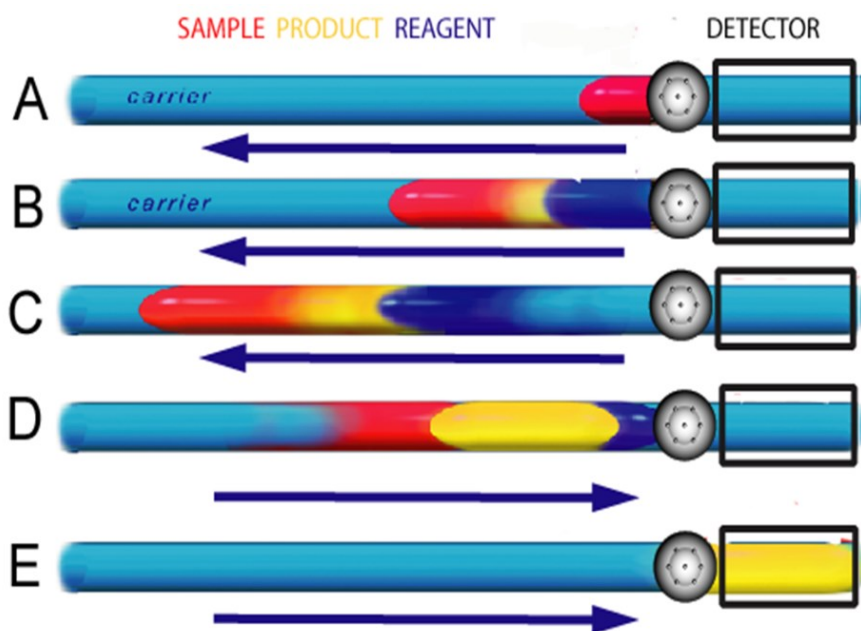
Tato průtoková analytická technika (SIA) byla vyvinuta jako zdokonalení průtokové injekční analýzy (FIA), díky tomu došlo k odstranění nevýhod FIA. SIA technika byla vyvinuta v roce 1990, za jejím zrodem stojí prof. J. Růžička a jeho výzkumný tým [31]. Tento výzkumný tým dokázal vyvinout systém, který je rychlý, využívá levné přístrojové vybavení a postup měření je plně automatizovaný. Mezi další výhody této techniky můžeme zahrnout například nízkou spotřebu vzorků, činidel i nosného proudu [32]

### 3.5.1. Princip SIA

SIA metody využívají princip, jehož typickým rysem jsou oddělené měřicí cykly. Systém využívá předem naprogramované kroky měření, které jsou provedeny v synchronizaci s přepínáním selekčního vícecestného ventilu, což je důležité pro opakovatelnost výsledků. To zajišťuje počítač s příslušným softwarem, ten jednotlivé kroky kontroluje a na konci analýzy také vyhodnotí data získaná daným měření [31].

Jednorázově nejprve dojde k aspiraci nosného média, vzorku a činidla pomocí selekčního vícecestného ventilu a pístového čerpadla. Následně je pohyb pístu čerpadla obrácen a dochází k promísení aspirovaných roztoků (dokonalé promísení zón vzorku a činidla). Výsledný produkt reakce je dopraven k detektoru, kde je změřen signál získaného produktu a poté v počítači (pomocí ovládacího programu) vyhodnocen [31].

Obrázek 6 názorně popisuje princip měření v SIA systému v jednotlivých krocích.



Obrázek 6: Zobrazení principu SIA metody [28][30]

(Carrier = nosný proud    Detector = detektor    MPV = vícecestný selekční ventil

Červená barva (Sample) = testovaný vzorek    Žlutá barva (Product) = Produkt

Tmavě modrá barva (Reagent) = činidlo)

- A – aspirace testovaného roztoku (vzorku)
- B – aspirace činidla
- C – promíchání činidla se vzorkem v mísící cívce
- D – obrácení směru toku směrem k detektoru a zlepšení tvorby komplexu (produktu)
- E – detekce produktu v detektoru a následné vyhodnocení signálu

### 3.5.2. Přístrojové vybavení používané v SIA

SIA systém se skládá ze dvou hlavních částí. Jedná se o průtokovou část a měřicí část. Jednotlivé komponenty jsou mezi sebou propojené pomocí tenkých hadiček vyrobených většinou z různých polymerních materiálů [33].

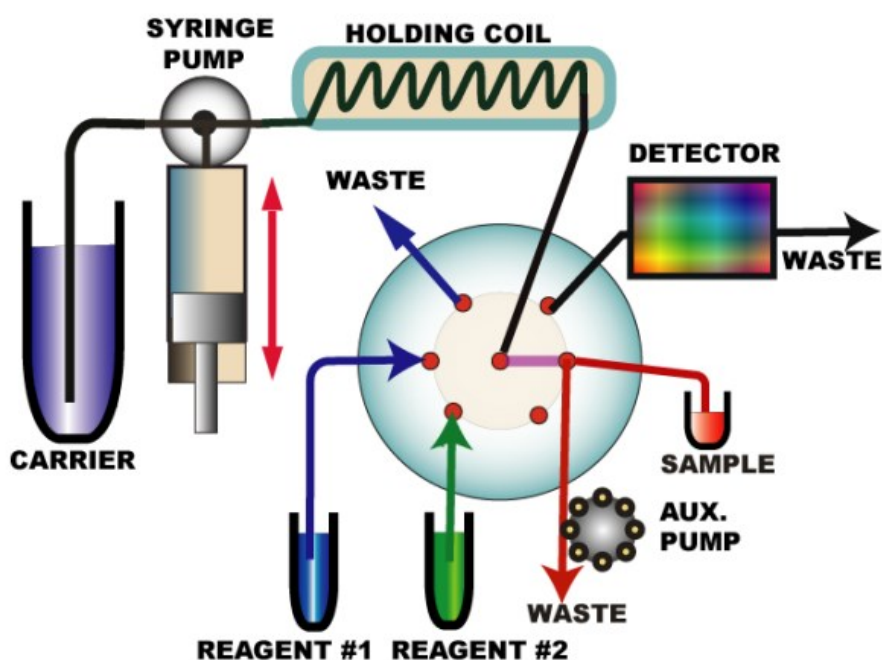
Jednou z hlavních komponent průtokové části SIA systému je počítač s příslušným softwarem a ovládacím programem, který ovládá celý proces měření a pomocí kterého jsou měněny podmínky měření [34]. Software ovládá jednonábové obousměrné pístové čerpadlo, které generuje definovaný tok nosného proudu. Čerpadlo je napojené na mísící cívku, kde jsou aspirované roztoky smíseny a vzniká zde výsledný produkt měření. Další součástí je vícecestný selekční ventil. Jedná se komponentu,



která řídí řazení jednotlivých zón v mísící cívce, zajišťuje aspiraci roztoků a jejich transport směrem k detektoru. Nejčastěji se setkáme s 6-10-cestným selekčním ventilem [31]. Selekční ventil je obvykle vyrobený z chemicky odolných polymerů (stator) a poly(tetrafluorethylenu) (rotor) [35].

Do měřicí části SIA systému náleží detektory. Jejich výběr není systémově omezen, záleží na druhu zvolené analytické metody. Používají se zejména spektrofotometry, fluorescenční detektory a elektrochemické detektory s vhodnými průtokovými celami [31].

Na Obrázku 7 je schematicky zobrazeno jedno z možných zapojení SIA systému.



Obrázek 7: Schéma SIA systému [28]

(carrier – nosný proud, syringe pump – pístové čerpadlo, holding coil – mísící cívka, waste – odpad, sample – vzorek, reagent – činidlo, detector – detektor, aux. pump – pomocné čerpadlo)

Před detektorem může být umístěná ještě jedna cívka, tzv. reakční cívka. Reakční cívka zajišťuje adekvátní promísení zón vzorku a činidla, aby bylo vytvořeno detekovatelné množství reakčního produktu [35].

### 3.5.3. Využití SIA systému

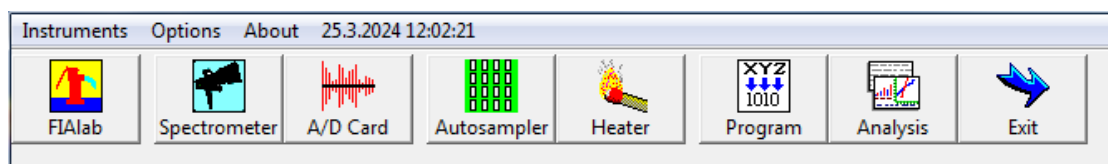
V 90. letech 20. století se SIA uplatňovala při stanovení anorganických iontů a jednoduchých organických látek včetně léčiv. V současnosti je SIA technika využívána hlavně pro rychlost analýzy, spolehlivost, jednoduchost, možnosti analýzy větší série vzorků, plnou automatizaci [31]. Tato analytická technika byla úspěšně aplikována při stanovení analytů ve vzorcích potravin a nápojů.

Detekce byla provedena za pomoci spektroskopických, turbidimetrických a elektrochemických metod [36]. SIA techniku lze využívat i v průmyslových odvětvích. K hlavním oblastem průmyslu můžeme zařadit například monitorování bioprocusů, rozbor odpadních a povrchových vod (zemědělství) a petrochemii [37]. V oblasti farmacie se tato technika může použít při stanovení obsahu látek v substancích, lékových formách a biologických materiálech s využitím automatizace kroku přípravy vzorku. Své uplatnění nachází i při stanovení obsahové stejnoměrnosti v lékových formách. Dále při monitorování disolučního procesu pevných lékových forem a k zjišťování vazby léčiv na bílkoviny. SIA se stala nedílnou součástí při práci ve výzkumu, kdy je tato metoda aplikována díky snadné a rychlé optimalizaci, možnosti sledovat reakční kinetiku a možnosti programovatelné úpravy reakčních podmínek [28].

### 3.5.4. Ovládací program SIA

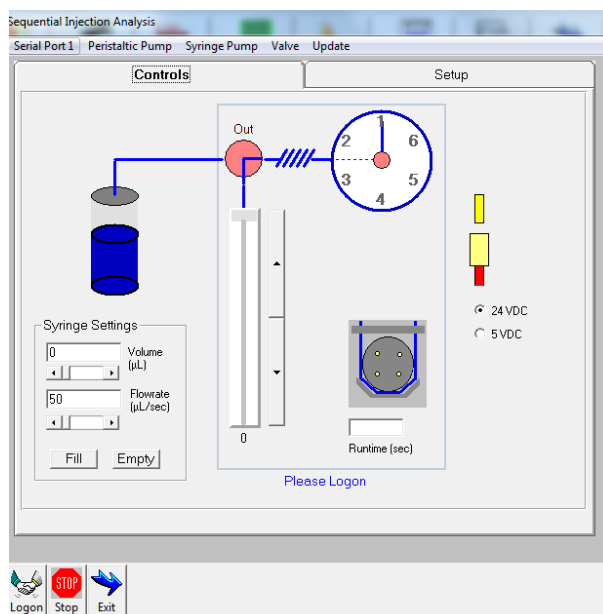
V této diplomové práci byly používány následující programy a ovládací operace.

SIA systém je propojený s počítačem. Ten řídí jednotlivé kroky pomocí programu FIALab for Windows 5.0. Při otevření tohoto programu se otevře hlavní panel s nástroji (Obrázek 8) [38].

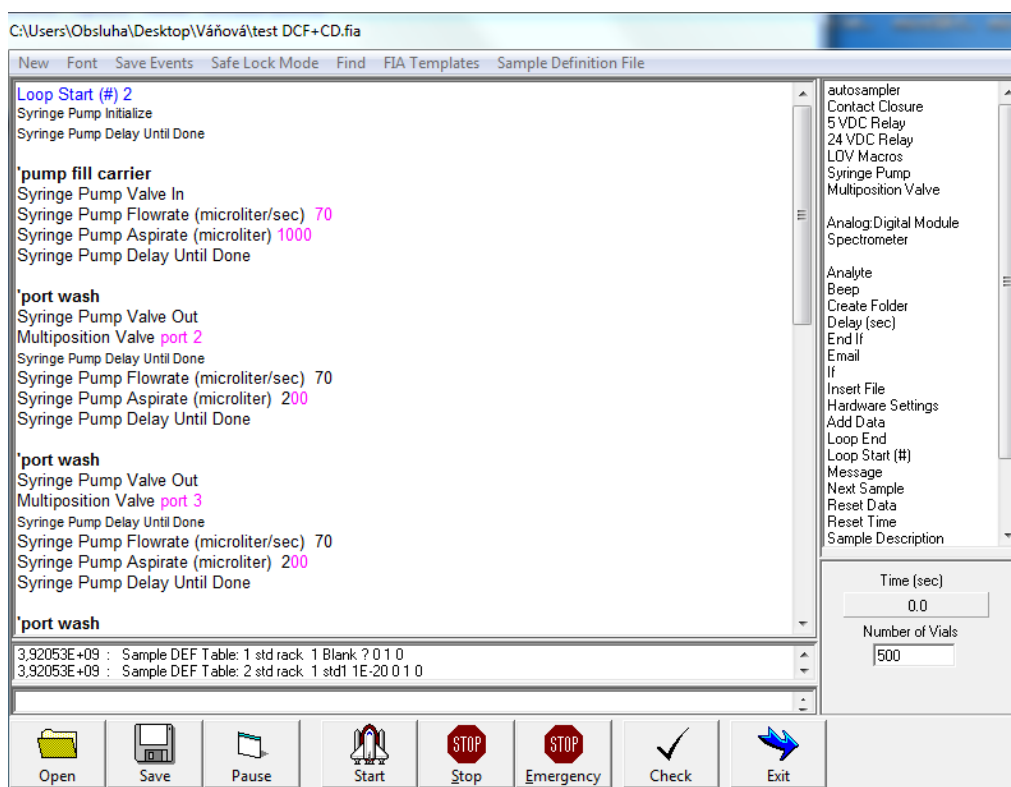


Obrázek 8: Hlavní panel programu FIALab for Windows 5.0

Před měřením je potřeba zajistit, aby byl SIA systém připojený a komunikoval s činností selekčního ventilu a pístového čerpadla. Proto je třeba nejprve SIA systém přihlásit (Obrázek 9). V tomto modulu je také možné měnit sestavu SIA systému, pokud jsou připojeny jiné/další součásti systému. Dále je potřeba sestavit ovládací program, který bude SIA systém vykonávat. V modulu Program je možné vytvořit nový ovládací program pomocí příkazů v pravém sloupečku, nebo můžeme otevřít již vytvořený ovládací program (ikona „Open“). Pro měření a uvedení SIA systému k činnosti stačí kliknout na ikonku „Start“. Na Obrázku 10 je zobrazen program, ve kterém lze vytvořit a následně spustit měření v SIA systému. Konkrétní ovládací programy jsou popsány v Experimentální části a jsou také uvedeny v Příloze.



Obrázek 9: Panel pro propojení ovládacího programu s SIA systémem



Obrázek 10: Tvorba a spuštění programu pro měření SIA

## 4. Experimentální část

### 4.1. Použité přístroje

- Pro vážení přesných navážek testovaného léčiva (DCF) a testovaných cyklodextrinů (CD) byly použity analytické váhy SARTORIUS 2004 MP (Německo)
- Spektrofluorimetr RF 6000 (Shimadzu Europe GmbH, Německo) kontrolovaný pomocí LabSolutions RF, měření prováděno v režimech Spectrum a Time Course.
- Křemenná fluorimetrická kyveta, optická dráha 1 x 1 cm (Agilent Technologies, Open-top UV quartz cell, 10 mm, objem 3,0 ml, Německo)
- Křemenná průtoková fluorimetrická kyveta (Suprasil® quartz, spektrální rozsah 200–2500 nm, délka dráhy 3 x 3 mm, objem komory 100 µl) (Hellma Analytics, Německo).
- MicroSIA systém, FIALab Instruments, (USA), s šesticestným selekčním ventilem a 2,5 ml pístovým čerpadlem ovládaný pomocí FIALab software for Windows 5.0, FIALab Instruments (USA)
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky – Spojovací materiál: hadičky z teflonu (PTFE)

### 4.2. Použité chemikálie

- Ultračistá voda připravená na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové přístrojem Milli-Q Direct Water Purification System (Merck spol. s.r.o., Česká republika)
  - Ředění roztoků, promytí systému SIA, nosné médium v SIA systému
- Ethanol denaturovaný 96% od firmy Lihovar Kolín, Česká republika
- Sodná sůl diklofenaku, č. šarže: DS/0405/120B, Akreditovaná laboratoř Katedry analytické chemie
- Karboxymethyl- $\alpha$ -CD  $\geq$  97% – Sigma – Aldrich, Praha, Česká republika
- (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD – Fluka, Německo
- Sodná sůl karboxymethyl- $\beta$  - CD Sigma – Aldrich, Praha, Česká republika
- Sukcinylní- $\beta$ - CD – Fluka, Německo
- $\alpha$ -CD, sulfatovaná forma sodné soli – Sigma – Aldrich, Praha, Česká republika

- $\alpha$ -CD-hydrát – Sigma – Aldrich, Praha, Česká republika
- $\gamma$ -CD, minimum 99% – Sigma – Aldrich, Praha, Česká republika
- $\beta$ -CD sulfatovaná sodná sůl – Sigma – Aldrich, Praha, Česká republika
- $\beta$ -CD hydrát – Sigma – Aldrich, Praha, Česká republika
- (2-hydroxypropyl)- $\alpha$ -CD – Fluka Chemika, Švýcarsko
- Dimethyl- $\beta$ -CD – Sigma – Aldrich, Praha, Česká republika
- Hydroxypropyl- $\beta$ -CD – Sigma – Aldrich, Praha, Česká republika
- Karboxymethyl- $\gamma$ -CD – Sigma – Aldrich, Praha, Česká republika
- kultivační médium Gibco Opti-MEM reduce serum (Life Technologies Corporation, USA)

### 4.3. Příprava roztoků

Jednotlivé chemikálie byly váženy na analytických vahách a následně rozpuštěny a ředěny ultračistou vodou do požadovaných koncentrací, ve skleněných odměrných baňkách potřebných objemů.

#### Roztok sodné soli diklofenaku

Zásobní roztok DCF byl připraven v koncentraci  $1 \times 10^{-2}$  mol/l v objemu 50 ml superčisté vody. Molární hmotnost DCF sodné soli je  $M_r = 318,13$  g/mol. Vzorec pro výpočet navážky:  $m = c \times M_r \times V = 0,01 \times 318,13 \times 0,05 = 0,15907$  g. Vzorový výpočet byl použit pro další (nižší) koncentrace DCF ( $1 \times 10^{-3}$  –  $1 \times 10^{-6}$  mol/l) a jednotlivé navážky byly ředěny superčistou vodou do baněk o objemu 5 ml, popřípadě byl zásobní roztok ředěn superčistou vodou pro přípravu roztoků o nižších koncentracích (u koncentrací  $1 \times 10^{-5}$  -  $1 \times 10^{-6}$  mol/l). Roztok byl uchováván v lednici a před měřením byl ponechán 30 minut mimo lednici, aby se ustálil na laboratorní teplotu. Později byl roztok DCF uskladněn rovnou za laboratorní teploty, protože bylo experimentálně zjištěno, že teplota má velký vliv na tvorbu komplexů DCF s CD.

#### Roztoky testovaných cyklodextrinů

Jednotlivé CD byly připraveny v koncentraci  $1 \times 10^{-2}$  mol/l a ředěny opět superčistou vodou v odměrných baňkách o objemu 25 ml, konkrétní hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 3. Uskladněny byly v chladničce při teplotě 2-8 °C, později byly stejně jako roztoky DCF připraveny v čas potřeby při laboratorní teplotě.

Tabulka 3: Přehled použitých CD, jejich molární hmotnosti a navážky, které byly ředěny superčistou vodou

CD	$M_r$ (g/mol)	$m$ (g)
$\alpha$ -CD-hydrát	972,86	0,2432

$\beta$ -CD sodná sůl	1134,98	0,2837
$\beta$ -CD hydrát	1137,01	0,2843
$\alpha$ -CD sulfatovaná sodná sůl	1070,92	0,2677
$\gamma$ -CD minimum 99%	1297,12	0,3243
(2-hydroxypropyl)- $\alpha$ -CD	1180,00	0,2950
(2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD	1580,00	0,3950
Hydroxypropyl- $\beta$ -CD	1375,36	0,3428
Karboxymethyl- $\alpha$ -CD	1045,00	0,2613
Karboxymethyl- $\beta$ -CD	1541,20	0,3853
Karboxymethyl- $\gamma$ -CD	1355,16	0,3388
Dimethyl- $\beta$ -CD	1331,40	0,3329
Sukcinyl- $\beta$ -CD	1833,50	0,4584

### Příprava komplexů DCF:CD

Pro experiment byly používány komplexy DCF:CD v různých poměrech (1:1, 1:2, 2:1) a různých koncentracích. Byly připraveny z předem připravených zásobních roztoků, které byly zředěny superčistou vodou do požadovaných koncentrací. Uskladněny byly ze začátku v ledničce, ale později (v návaznosti na výsledky experimentálních měření) byly uskladněny za laboratorní teploty a měřeny jak v čas přípravy, tak i den po smísení při laboratorní teplotě (vyšší signál vznikajícího komplexu).

## 4.4. Experimentální podmínky luminiscenčního stanovení DCF

V rámci experimentů pro testování luminiscenčního stanovení DCF byly použity následující přístroje: Spektrofluorimetr Shimadzu RF 6000 a MicroSIA systém.

### 4.4.1. Spektrofluorimetr

Spektrofluorimetr používaný při experimentu byl vybavený xenonovou lampou o výkonu 150 W, duálním monochromátorem pro měření excitační a emisní vlnové délky v rozsahu 200-800 nm, 1 cm fluorimetrickou manuálně plněnou kyvetou o objemu 3 ml, průtokovou kyvetou o objemu 100  $\mu$ l, která byla použita pro propojení s průtokovým systémem. Důležitou součástí byl ovládací program LabSolutions RF pro nastavení parametrů měření, ovládání, ukládání a vyhodnocení získaných dat.

#### 4.4.1.1. Předběžné testování luminiscenčních vlastností komplexů DCF:CD

Předběžné testování bylo provedeno s využitím manuálně plněné fluorescenční kyvety a testování jednotlivých CD samostatně a v komplexu s DCF v různých poměrech. Bylo potřeba zjistit, v jakých vlnových délkách vykazuje DCF a CD excitační a emisní maximum proměřením obou typů spekter. Proto byla ve spektrofluorimetru využita funkce „Spectrum“ a v nastavení byly testovány parametry jako

rozsah spekter, šířka štěrbin pro EX a EM záření, data interval, rychlost skenování a také citlivost detektoru (viz Tabulka 4).

Tabulka 4: Souhrn nastavení spektrofluorimetru pro předběžná měření EX a EM spekter

Typ spektra Excitační	
Začátek EX vlnové délky (nm)	200,0
Konec EX vlnové délky (nm)	500,0
EM vlnová délka (nm)	362,0
Data interval (nm)	1,0
Rychlost skenování (nm/min)	600,0
EX Bandwidth (nm)	3,0
EM Bandwidth (nm)	3,0
Citlivost	High
Typ spektra Emisní	
Začátek EM vlnové délky (nm)	300,0
Konec EM vlnové délky (nm)	600,0
EX vlnová délka (nm)	289,0
Data interval (nm)	1,0
Rychlost skenování (nm/min)	600,0
EX Bandwidth (nm)	3,0
EM bandwidth (nm)	3,0
Citlivost	High

Nejdřív bylo nastavení spektrofluorimetru vyzkoušeno pro  $\alpha$ -CD-hydrát. Poté byl proměřen komplex  $\alpha$ -CD-hydrát : DCF v poměru 1:1, následně v poměru 1:2 a 2:1. Stejně podmínky měření byly testovány i se sodnou solí sulfatovaného  $\beta$ -CD.

Koncentrace testovaných CD byla 0,01 mol/l a DCF  $1 \times 10^{-5}$  mol/l, stejné koncentrace byly použity u všech testovaných CD a všechny roztoky byly ředěny superčistou vodou. Jednotlivá měření se lišila rozsahem excitačního a emisního spektra a velikostí štěrbin.

Z dosažených výsledků bylo upřesněno nastavení spektrofluorimetru na optimální podmínky uvedené v Tabulce 5.

Tabulka 5: Souhrn finálního nastavení spektrofluorimetru pro EX a EM spektra

Typ spektra Excitační	
Začátek EX vlnové délky (nm)	200,0
Konec EX vlnové délky (nm)	500,0
EM vlnová délka (nm)	364,5
Data interval (nm)	1,0
Rychlost skenování (nm/min)	600,0
EX Bandwidth (nm)	20,0

EM Bandwidth (nm)	20,0
Citlivost	High
Typ spektra Emisní	
Začátek EM vlnové délky (nm)	300,0
Konec EM vlnové délky (nm)	600,0
EX vlnová délka (nm)	290
Data interval (nm)	1,0
Rychlost skenování (nm/min)	600,0
EX Bandwidth (nm)	20,0
EM bandwidth (nm)	20,0
Citlivost	High

#### 4.4.1.2. Výběr CD za použití manuálně plněné kyvety

Po zjištění podmínek měření bylo třeba otestovat jednotlivé CD. Spektrofluorimetr byl nastaven jako je popsáno v Tabulce 5.

Postupně bylo proměřeno všech 13 CD (viz. Kapitola 4.2.). Jednotlivé CD byly měřeny v poměru 1:1 s DCF a v poměru 1:1 se superčistou vodou. DCF byl využíván ze zásobního roztoku uskladněného v ledničce a před měřením byla jeho teplota po dobu 30 min ustálena na laboratorní teplotu (koncentrace DCF byla  $1 \times 10^{-5}$  mol/l). Jednotlivé CD byly připraveny v čas potřeby o koncentraci 0,01 mol/l.

#### 4.4.1.3. Stabilita vybraných komplexů CD s DCF

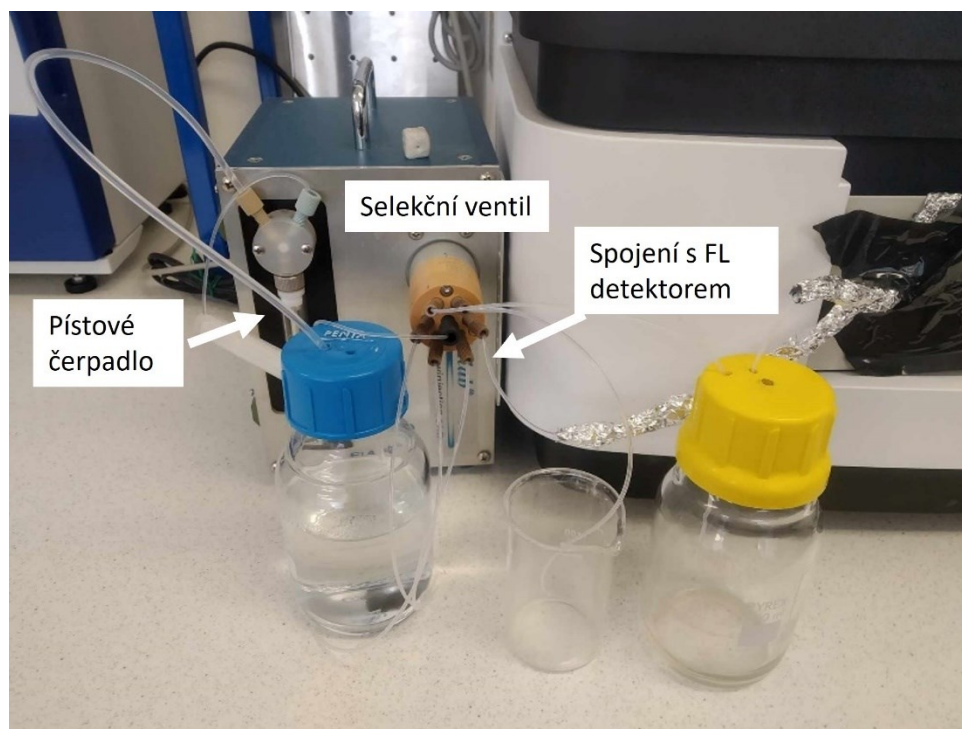
Následně byly měřeny vybrané CD (Tabulka 6). Spektrofluorimetr byl nastaven tak, jak je zobrazeno v Tabulce 5. Jednotlivá měření byla opakována v intervalu 5 min a byl sledován pokles nebo nárůst signálů testovaných komplexů.

Tabulka 6: Přehled komplexů CD: DCF

Komplex CD:DCF	Testované poměry
$\alpha$ -CD-hydrát : DCF	1:1, 1:2
$\beta$ -CD sulfatovaná sůl : DCF	1:1, 1:2
$\alpha$ -CD sulfatovaná sodná sůl : DCF	1:1
$\beta$ -CD hydrát : DCF	1:1
$\gamma$ -CD : DCF	1:1
Karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF	1:1



#### 4.4.2. SIA



Obrázek 11: Schéma použitého SIA systému

SIA systém (viz Obrázek 11) byl ovládaný pomocí programu FIALab for Windows 5.0. Systém SIA se skládal z pístového obousměrného čerpadla, které umožňuje rychlou a jednoduchou změnu směru toku nosného proudu při plnění nebo vyprazdňování objemu pístu. Poloha dvoucestného ventilu IN umožnila nasávat nosný proud do dutiny pístu čerpadla. Poloha dvoucestného ventilu OUT umožnila spojení s mísící cívku. Dále systém obsahoval mísící cívku, sloužící k promísení dvou či více aspirovaných zón malého objemu. Důležitou součástí SIA systému byl šesticestný selekční ventil (pozice 1-6 obvodové porty, v pozicích 1 a 6 spojen s odpadem). Pozice 2-4 byly určeny pro aspiraci testovaných roztoků (CD, DCF, případně superčistá voda) a pozice 5 byla propojena s průtokovou celou detektoru (spektrofluorimetr). Nosným médiem pro experiment byla superčistá voda. Měření probíhalo pomocí předem naprogramovaného ovládacího programu.

##### 4.4.2.1. SIA ovládací programy

Před každým měřením byl celý systém minimálně dvakrát promyt superčistou vodou. Aspirace nosného proudu byla nastavena na 1000  $\mu\text{l}$  s průtokovou rychlostí 70  $\mu\text{l/s}$ .

Porty 2, 3, 4 a 6 byly promyty superčistou vodou objemem 200  $\mu\text{l}$ , při průtokové rychlosti 70  $\mu\text{l/s}$ . Nakonec byl promyt i port 5 a s ním průtoková cela detektoru průtokovou rychlostí 40  $\mu\text{l/s}$ .

Dále bylo naprogramováno 5 ovládacích programů. Jedná se o program 1 umožňující aspiraci DCF a CD ze 2 různých portů selekčního ventilu. Dále o program 2 s aspirací DCF a CD předem smíšených a aspirovaných pouze z jednoho portu, program 3 promísil DCF a CD v mísící cívce pomocí změny směru toku, program 4 umožnil DCF a CD v mísící cívce zastavit a po zvolené době transportovat do detektoru. Poslední program 5 promísil změnou směru toku a zastavil aspirované roztoky v mísící cívce před jejich detekcí. U těchto programů byla nastavena průtoková rychlost 30  $\mu\text{l/s}$  a aspirované objemy jednotlivých roztoků 30  $\mu\text{l}$  (při poměru komplexu CD : DCF 1:2 byl objem aspirovaného DCF 60  $\mu\text{l}$ ). Vybrané programy jsou popsány v Příloze.

#### 4.4.2.2. Fluorimetrické měření v SIA systému

Další měření již bylo prováděno v SIA systému s průtokovou kvyetou a s využitím modulu „Time course“ v LabSolutions softwaru spektrofluorimetru. Tabulka 7 uvádí nastavení detektoru.

Tabulka 7: Nastavení spektrofluorimetru při využití programu „Time course“

EX Wavelength (nm)	290,0
EM Wavelength (nm)	380,0
Timing Mode	Auto
Time unit	Second
Total time	různý v závislosti na délce měření
Cycle time (s)	0,10
EX Bandwidth (nm)	20,0
EM Bandwidth (nm)	20,0
Sensitivity	High
Accumulation Time (s)	1

#### Podmínky měření v SIA systému

Všechna průtoková měření byla prováděna třikrát. Koncentrace CD byly 0,01 mol/l a koncentrace sodné soli DCF byla  $1 \times 10^{-5}$  mol/l. Roztoky CD byly nově připraveny v den měření a uchovány při laboratorní teplotě. Zatímco roztok sodné soli DCF byl uskladněn v lednici a byl 30 min před měřením ustálen na laboratorní teplotu.

Nejprve byl proměřený komplex  $\alpha$ -CD-hydrát : DCF v poměru 1:2, aby byly zjištěny optimální podmínky měření v průtokovém systému. Při tomto měření byl využit SIA program 1, tedy roztoky byly připraveny do dvou baněk, ze kterých byly aspirovány do SIA systému, kde byly smíseny a poté detekovány. Byl testován různý „accumulation time“ (1 s, 500 ms, 200 ms, 100 ms, 50 ms, 20 ms a 10 ms). Dále byla proměřena různá průtoková rychlost (50  $\mu\text{l/s}$ , 40  $\mu\text{l/s}$ , 30  $\mu\text{l/s}$ , 25  $\mu\text{l/s}$ , 20  $\mu\text{l/s}$ , 15  $\mu\text{l/s}$ ).

Jako další byl vyzkoušen ovládací program 3. Tento program zajišťoval, že aspirované roztoky byly promíchány v cívce SIA systému a poté byly detekovány (jednalo se o dvojité promísení). Průtokové rychlosti při tomto měření byly nastaveny na 30  $\mu\text{l/s}$ , 40  $\mu\text{l/s}$  a 50  $\mu\text{l/s}$ .

Další pokus byl zaměřen na využití nového programu 4. Tento ovládací program umožňoval aspiraci testovaných roztoků do mísící cívky SIA systému z více portů a následné zastavení v mísící cívce po dobu např. 10 s. Průtoková rychlost při tomto měření byla 30  $\mu\text{l/s}$ . Souhrn testování  $\alpha$ -CD-hydrátu popisuje Tabulka 8. Před měřením  $\alpha$ -CD-hydrát : DCF (1:2) z jednoho portu, byl roztok manuálně smísen odebráním 5 ml  $\alpha$ -CD-hydrát a 10 ml DCF do jedné odměrné baňky.

Tabulka 8: Přehled testování  $\alpha$ -CD hydrátu nebo komplexu  $\alpha$ -CD hydrátu : DCF ( $\text{H}_2\text{O}$ ) s využitím ovládacího programu 4 nebo kombinací programů 2 a 4 při testování různého času zastavení v mísící cívce.

Komplex	Poměr	Program	Testované parametry
$\alpha$ -CD-hydrát : $\text{H}_2\text{O}$	1:1	Program 4	Aspirovaný objem CD 30 $\mu\text{l}$ Aspirovaný objem $\text{H}_2\text{O}$ 30 $\mu\text{l}$ Čas zastavení 10 s
$\alpha$ -CD-hydrát : DCF	1:2	Program 4	Aspirovaný objem CD 30 $\mu\text{l}$ Aspirovaný objem DCF 60 $\mu\text{l}$ Čas zastavení 10 s
$\alpha$ -CD-hydrát : DCF	1:2	Program 2 a 4	Aspirovaný objem komplexu 30 $\mu\text{l}$ Čas zastavení 10 s
$\alpha$ -CD-hydrát	-	Program 2 a 4	Aspirovaný objem CD 30 $\mu\text{l}$ Čas zastavení 10 s
$\alpha$ -CD-hydrát : DCF	1:2	Program 4	Aspirovaný objem CD 30 $\mu\text{l}$ Aspirovaný objem DCF 60 $\mu\text{l}$ Čas zastavení 10/15/20/25/30 s

Podobně byl testován karboxymethyl- $\alpha$ -CD (Tabulka 9).

Tabulka 9: Přehled testování komplexů karboxymethyl- $\alpha$ -CD: sodné soli DCF ( $\text{H}_2\text{O}$ ) za využití ovládacích programů 1, 2 nebo 4, při měření různých průtokových rychlostí nebo různého času zastavení v mísící cívce.

Komplex	Poměr	Program	Testované parametry
Karboxymethyl- $\alpha$ -CD : $\text{H}_2\text{O}$	1:1	Program 1	Průtoková rychlost 30/40/50 $\mu\text{l/s}$ Aspirovaný objem CD 30 $\mu\text{l}$ Aspirovaný objem $\text{H}_2\text{O}$ 30 $\mu\text{l}$
Karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF	1:1	Program 1	Průtoková rychlost 30/40/50 $\mu\text{l/s}$ Aspirovaný objem CD 30 $\mu\text{l}$ Aspirovaný objem DCF 30 $\mu\text{l}$
Karboxymethyl- $\alpha$ -CD : $\text{H}_2\text{O}$	1:1	Program 2	Průtoková rychlost 30/40/50 $\mu\text{l/s}$ Aspirovaný objem komplexu 30 $\mu\text{l}$
Karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF	1:1	Program 2	Průtoková rychlost 30/40/50 $\mu\text{l/s}$ Aspirovaný objem komplexu 30 $\mu\text{l}$
Karboxymethyl- $\alpha$ -CD : $\text{H}_2\text{O}$	1:1	Program 4	Průtoková rychlost 30 $\mu\text{l/s}$ Aspirovaný objem CD 30 $\mu\text{l}$ Aspirovaný objem $\text{H}_2\text{O}$ 30 $\mu\text{l}$ Čas zastavení 10/15/20/25/30 s
Karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF	1:1	Program 4	Průtoková rychlost 30 $\mu\text{l/s}$ Aspirovaný objem CD 30 $\mu\text{l}$ Aspirovaný objem DCF 30 $\mu\text{l}$ Čas zastavení 10/15/20/25/30 s

Testován byl i (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD (Tabulka 10).

Tabulka 10: Přehled testování komplexů (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : sodné soli DCF ( $H_2O$ ) za využití ovládacích programů 1 nebo 2, při měření různých průtokových rychlostí.

Komplex	Poměr	Program	Testované parametry
(2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD: $H_2O$	1:1	Program 1	Průtoková rychlost 30/40/50 $\mu$ l/s Aspirovaný objem CD 30 $\mu$ l Aspirovaný objem $H_2O$ 30 $\mu$ l
(2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD: DCF	1:1	Program 1	Průtoková rychlost 30/40/50 $\mu$ l/s Aspirovaný objem CD 30 $\mu$ l Aspirovaný objem DCF 30 $\mu$ l
(2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD: $H_2O$	1:1	Program 2	Průtoková rychlost 30/40/50 $\mu$ l/s Aspirovaný objem komplexu 30 $\mu$ l
(2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD: DCF	1:1	Program 2	Průtoková rychlost 30/40/50 $\mu$ l/s Aspirovaný objem komplexu 30 $\mu$ l

### Měření po 24 hodinách

Testované komplexy roztoků karboxymethyl- $\alpha$ -CD:DCF a (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD:DCF byly následně na 24 hodin ode dne přípravy uskladněny za laboratorní teploty a poté znovu proměřeny. Komplexy byly testovány při průtokové rychlosti 30  $\mu$ l/s za využití SIA programu 2. Aspirované objemy komplexů byly 30  $\mu$ l. Následně byly výsledky tohoto měření porovnány s měřením, kdy dané komplexy roztoků byly připraveny v čas potřeby (v den měření), Tabulka 11.

Tabulka 11: Přehled podmínek testování vybraných CD po 24 hod uskladnění za laboratorní teploty

Komplex	Poměr	Program	Testované parametry
Karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF	1:1	Program 2	Průtoková rychlost 30 $\mu$ l/s Aspirovaný objem komplexu 30 $\mu$ l
(2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD: DCF	1:1	Program 2	Průtoková rychlost 30 $\mu$ l/s Aspirovaný objem komplexu 30 $\mu$ l

### Měření při zastavení toku v mísící cívce

Další měření bylo zaměřeno na testování kinetiky vzniku komplexu CD : DCF. Nejprve byl využit program 4, který umožňoval aspiraci roztoků ze dvou portů, směs byla zastavena v mísící po zvolenou dobu a následně byla detekována. Čas, po který byla směs zastavena v mísící cívce, byl testován pro 5 min, 10 min, 20 min (celková doba „Time course“ měření byla nastavena podle zvolených intervalů), Tabulka 12.

Tabulka 12: Přehled podmínek testování karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF (1:1) a (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD: DCF (1:1) při různých časech zastavení v mísící cívce a využití ovládacího programu 4.

Komplex	Poměr	Program	Testované parametry
Karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF	1:1	Program 4	Průtoková rychlost 30 $\mu$ l/s Aspirovaný objem CD 30 $\mu$ l Aspirovaný objem DCF 30 $\mu$ l Čas zastavení 5 min, 10 min, 20 min
(2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD: DCF	1:1	Program 4	Průtoková rychlost 30 $\mu$ l/s

			Aspirovaný objem CD 30 $\mu$ l Aspirovaný objem DCF 30 $\mu$ l Čas zastavení 5 min, 10 min, 20 min
--	--	--	--

Dále byl využit ovládací program 5, který umožňuje aspiraci roztoků, následně je promíchá a poté je zastaví v mísící cívce na 10 min. Proměřen byl karboxymethyl- $\alpha$ -CD (0,01 mol/l) : DCF ( $1 \times 10^{-5}$  mol/l) (1:1) a (2- hydroxypropyl)-  $\alpha$ -CD (0,01mol/l) : DCF ( $1 \times 10^{-5}$  mol/l) (1:1), Tabulka 13.

Tabulka 13: Přehled podmínek testování karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF (1:1) a (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD: DCF (1:1) času zastavení v mísící cívce 10 min a využití ovládacího programu 5.

Komplex	Poměr	Program	Testované parametry
Karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF	1:1	Program 5	Průtoková rychlost 30 $\mu$ l/s Aspirovaný objem CD 30 $\mu$ l Aspirovaný objem DCF 30 $\mu$ l Čas zastavení 10 min
(2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD: DCF	1:1	Program 5	Průtoková rychlost 30 $\mu$ l/s Aspirovaný objem CD 30 $\mu$ l Aspirovaný objem DCF 30 $\mu$ l Čas zastavení 10 min

## 4.5. Měření kalibrační závislosti ve vodě

Pro kalibraci byl vybrán (2- hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD. Příprava roztoků CD a DCF byla popsána v kapitole 4.3. Ke kalibraci bylo nutno zředit DCF na nižší koncentrace, ředění bylo prováděno superčistou vodou. Měření bylo prováděno třikrát a následně byla ze získaných hodnot spočítána průměrná hodnota intenzit FL signálů. Kalibrační přímka byla popsána rovnicí  $y=kx+q$ , kde  $x$  je koncentrace,  $y$  je hodnota intenzity FL signálu,  $k$  je směrnice přímky a  $q$  je absolutní člen směrnice přímky. Kalibrace byla hodnocena pomocí lineární regrese, hodnotou determinačního koeficientu byla hodnocena linearita.

Měření probíhalo v SIA systému ovládacím programem 5 se zastavením po dobu 1 min, 10 min v koncentračním rozmezí  $1 \times 10^{-1}$  –  $1 \times 10^{-6}$  mol/l, konkrétní koncentrace DCF jsou uvedeny v Tabulce 14.

Tabulka 14: Přehled testování komplexu CD : DCF při testování různých koncentrací DCF, s využitím ovládacího programu 5 a různým časem zastavení v mísící cívce

Komplex	Poměr	Koncentrace CD (mol/l)	Koncentrace DCF (mol/l)	Program	Testované parametry
(2- hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : DCF	1:1	$1 \times 10^{-2}$	$1 \times 10^{-6}$ , $2,5 \times 10^{-6}$ , $5 \times 10^{-6}$ , $7,5 \times 10^{-6}$ , $1 \times 10^{-5}$ , $5 \times 10^{-7}$	Program 5	Čas zastavení 10 min
(2- hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : DCF	1:1	$1 \times 10^{-2}$	$1 \times 10^{-6}$ , $2,5 \times 10^{-6}$ , $5 \times 10^{-6}$ , $7,5 \times 10^{-6}$ , $5 \times 10^{-7}$ , $2,5 \times 10^{-7}$ , $7,5 \times 10^{-7}$	Program 5	Čas zastavení 1 min

### Změna koncentrace CD

Měření dále pokračovalo změnou koncentrace (2- hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD a to na koncentraci  $1 \times 10^{-3}$  mol/l a  $1 \times 10^{-4}$  mol/l (roztoky byly připraveny ředěním zásobního roztoku CD  $1 \times 10^{-2}$  mol/l). Koncentrace DCF byly vybrány  $1 \times 10^{-6}$ ,  $2,5 \times 10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $7,5 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  mol/l (roztoky byly uskladněny na 24 hod za laboratorní teploty). Použit byl ovládací program 5 a čas zastavení komplexu v mísící cívce byl nastaven na 1 min (viz Tabulka 15).

Tabulka 15: Přehled testování komplexu CD : DCF při změně koncentrací CD, s využitím ovládacího programu 5 a časem zastavení v mísící cívce 1 min

Komplex	Poměr	Koncentrace CD (mol/l)	Koncentrace DCF (mol/l)	Program	Testované parametry
(2- hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : DCF	1:1	$1 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{-6}$ , $2,5 \times 10^{-6}$ , $5 \times 10^{-6}$ , $7,5 \times 10^{-6}$ , $1 \times 10^{-5}$	Program 5	Čas zastavení 1 min
(2- hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : DCF	1:1	$1 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-6}$ , $2,5 \times 10^{-6}$ , $5 \times 10^{-6}$ , $7,5 \times 10^{-6}$ , $1 \times 10^{-5}$	Program 5	Čas zastavení 1 min

### Měření roztoků uskladněných 1-2 dny za laboratorní teploty

Následující měření se lišilo od předchozích tím, že byly využity roztoky, které byly uskladněny 1-2 dny za laboratorní teploty a následně bylo provedeno měření. Proměřené kombinace CD a DCF jsou uvedené v Tabulce 16.

Provedení a podmínky měření byly shodné jako v předchozím měření.

Tabulka 16: Souhrn podmínek měření pro proměření roztoků, které byly uskladněny 1-2 dny za laboratorní teploty a následně proměřeny pomocí ovládacího programu 5

Komplex	Poměr	Koncentrace CD (mol/l)	Koncentrace DCF (mol/l)	Program	Testované parametry
(2- hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : DCF	1:1	$1 \times 10^{-2}$	$2,5 \times 10^{-7}$ , $5 \times 10^{-7}$ , $7,5 \times 10^{-7}$ , $1 \times 10^{-6}$ , $2,5 \times 10^{-6}$ , $5 \times 10^{-6}$ , $7,5 \times 10^{-6}$ , $1 \times 10^{-5}$	Program 5	Čas zastavení 1 min
(2- hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : DCF	1:1	$1 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-7}$ , $5 \times 10^{-7}$ , $7,5 \times 10^{-7}$ , $1 \times 10^{-6}$ , $2,5 \times 10^{-6}$ , $5 \times 10^{-6}$ , $7,5 \times 10^{-6}$ , $1 \times 10^{-5}$	Program 5	Čas zastavení 1 min
(2- hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : DCF	1:1	$1 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-7}$ , $5 \times 10^{-7}$ , $7,5 \times 10^{-7}$ , $1 \times 10^{-6}$ , $2,5 \times 10^{-6}$ , $5 \times 10^{-6}$ , $7,5 \times 10^{-6}$ , $1 \times 10^{-5}$	Program 5	Čas zastavení 1 min

## 4.6. Měření kalibrační závislosti s kultivačním médiem

Pro toto měření byl testován (2- hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD. V návaznosti na výsledky předchozího měření byla vybrána koncentrace CD  $1 \times 10^{-4}$  mol/l a  $1 \times 10^{-3}$  mol/l.

Ze zásobního roztoku DCF (o koncentraci  $1 \times 10^{-2}$  mol/l), který byl ředěn superčistou vodou, byly připraveny koncentrace  $2 \times 10^{-7}$  mol/l –  $1 \times 10^{-5}$  mol/l. Konkrétní koncentrace DCF jsou uvedeny v Tabulce 17. Nově připravené roztoky DCF byly ředěny kultivačním médiem Gibco Opti-MEM reduce serum. Poměry aspirovaných objemů DCF : CD byly 1:1, při využití 30  $\mu$ l. Roztoky CD a zásobní roztok DCF byly uskladněny za laboratorní teploty. Kultivační médium bylo uskladněno v lednici a před mísením byla jeho teplota ustálena na laboratorní teplotu po dobu 30 min. Měření probíhalo v SIA systému s pomocí ovládacího programu 5 se zastavením po dobu 1 min. Výsledky měření poskytly signály, ze kterých byla vypočítána průměrná hodnota, dále byl sestrojen graf závislosti intenzit FL signálů na koncentraci DCF a byla sestrojena kalibrační přímka.

Tabulka 17: Souhrn podmínek měření za využití kultivačního média Gibco Opti-MEM

Komplex	Poměr	Koncentrace CD (mol/l)	Koncentrace DCF (mol/l)	Program	Testované parametry
(2- hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : DCF médium	1:1	$1 \times 10^{-4}$ , $1 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-7}$ , $5 \times 10^{-7}$ , $7,5 \times 10^{-7}$ , $1 \times 10^{-6}$ , $2,5 \times 10^{-6}$ , $5 \times 10^{-6}$ , $7,5 \times 10^{-6}$ , $1 \times 10^{-5}$	Program 5	Čas zastavení 1 min

*Pozn.:* DCF médium= zásobní roztok DCF zředěn kultivačním médiem do požadovaných koncentrací

*Pozn.:* Zásobní DCF = DCF jehož navážka byla ředěna superčistou vodou na koncentraci 0,01M

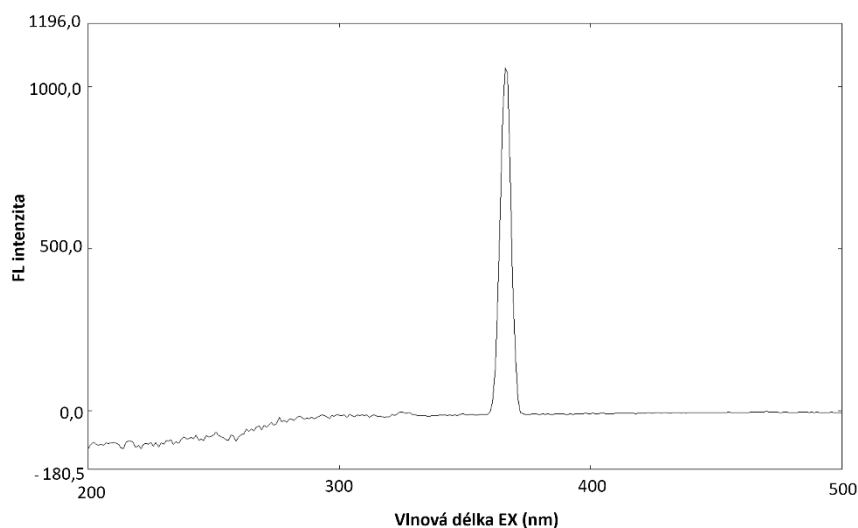
*Pozn.:* kultivační médium = Gibco Opti-MEM reduce serum= obsahuje Hepes, 2,4 g/L sodium bicarbonata, L- glutamin

## 5. Výsledky a diskuse

### 5.1. Předběžné testování luminiscenčních vlastností komplexů CD : DCF

Úvodní testování bylo provedeno za účelem zjištění podmínek a nastavení spektrofluorimetru a nalezení optimální EM a EX vlnové délky v obou spektrech. Podmínky a použité testované roztoky jsou popsány v kapitole 4.4.1.1. Nastavení spektrofluorimetru popisuje Tabulka 4. Úvodní testování bylo provedeno podle podmínek nalezených v odborné literatuře. Excitační spektrum bylo měřeno při emisní vlnové délce 362 nm a pro rozsah excitačních vlnových délek 200–500 nm. Emisní spektrum bylo měřeno při excitační vlnové délce 389 nm, pro rozsah emisních vlnových délek 300-600 nm [8].

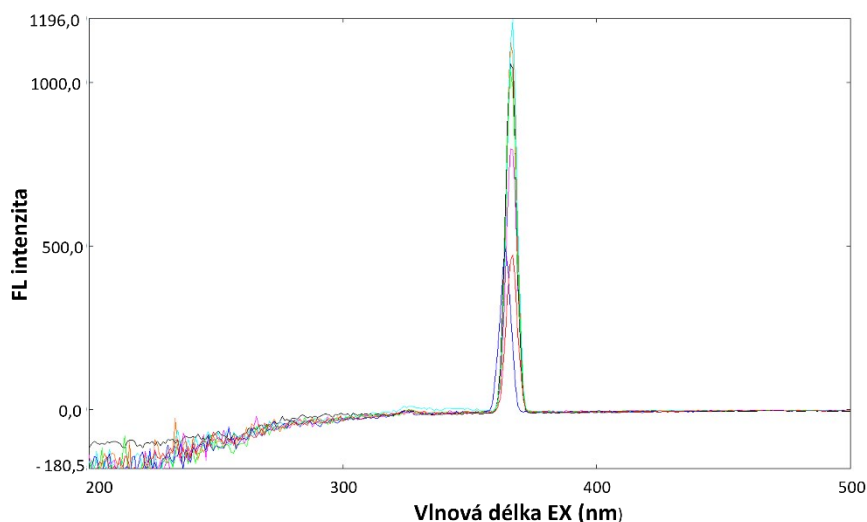
Na Obrázku 12 je zobrazeno excitační spektrum samotného  $\alpha$ -CD-hydrátu.



Obrázek 12: Excitační spektrum  $\alpha$ -CD-hydrátu

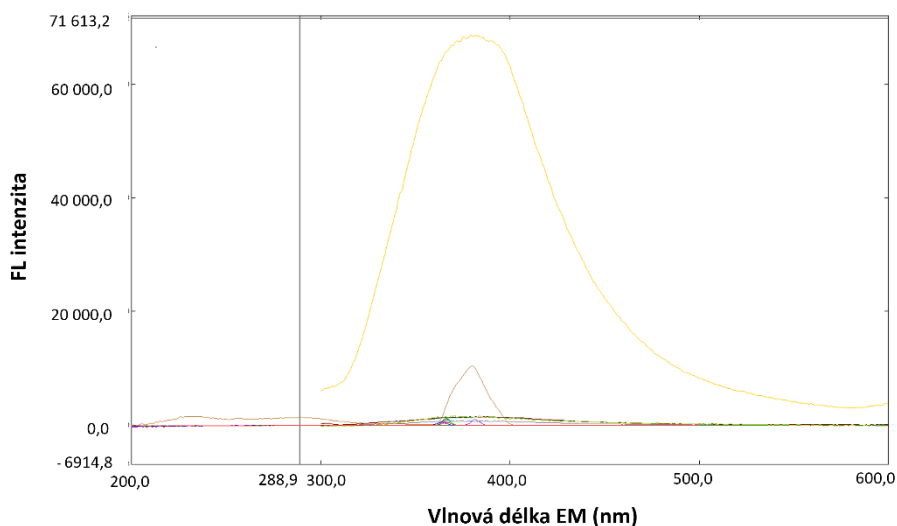
Při proměřování dalších komplexů (viz. kapitola 4.4.1.1.) poskytly všechny komplexy podobné excitační spektrum jako  $\alpha$ -CD-hydrát. Tato excitační spektra jsou zobrazena na Obrázku 13.





Obrázek 13: Excitační spektra pro  $\alpha$ -CD-hydrát, komplex  $\alpha$ -CD- hydrát : DCF (1:1,1:2 a 2:1), komplex sulfatované sodné soli  $\beta$ -CD (1:1,1:2 a 2:1) a samotné sulfatované sodné soli  $\beta$ -CD

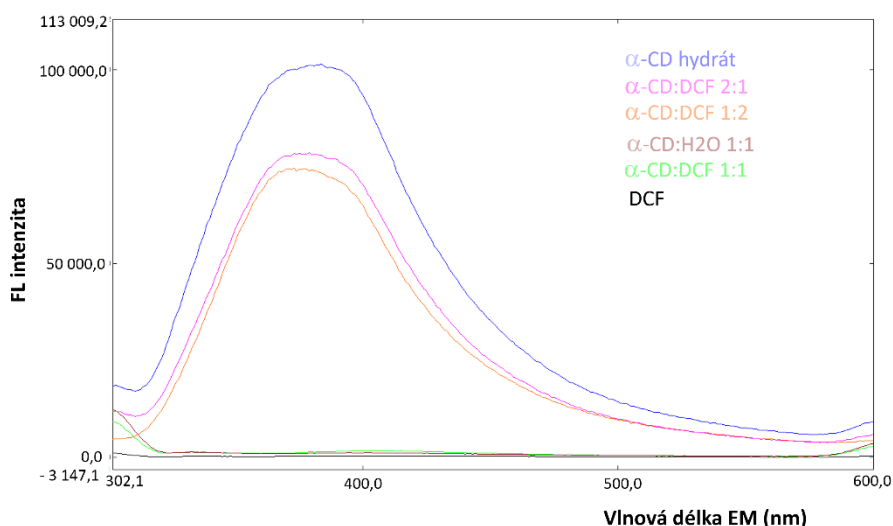
Na Obrázku 14 je proměřené emisní spektrum jednotlivých testovaných komplexů.



Obrázek 14: Emisní spektra pro zjištění optimálních podmínek měření

Díky tomuto měření bylo zjištěno, že látky vykazují excitaci při 290 nm a emisi při 380 nm, což v podstatě odpovídá hodnotám nalezeným v literatuře [8] a hodnoty byly ověřeny experimentálně s využitím instrumentálního vybavením uvedeným v kapitole 4.1.

Po novém nastavení spektrofluorimetru, které popisuje Tabulka 5 (širší štěrby/pásky EX a EM vlnových délek) byla znovu proměřena emisní spektra komplexů  $\alpha$ -CD-hydrátu : DCF a  $\beta$ -CD sodné soli : DCF.

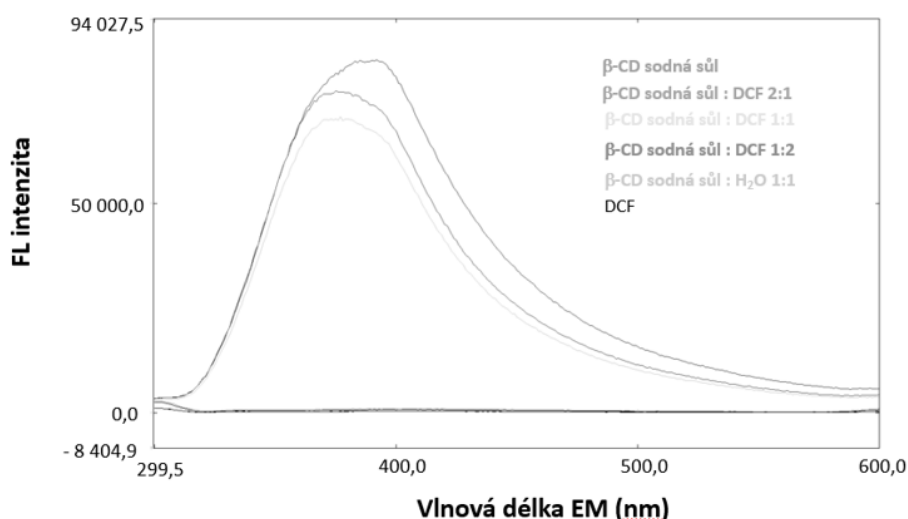


Obrázek 15: Emisní spektra  $\alpha$ -CD-hydrátu v různých poměrech s DCF, popřípadě s  $H_2O$

Obrázek 15 znázorňuje proměření  $\alpha$ -CD-hydrátu : DCF v různých poměrech a pro porovnání také  $\alpha$ -CD-hydrátu :  $H_2O$  1:1.

Z grafu (na Obrázku 15) je patrné, že samotný  $\alpha$ -CD-hydrát vykazuje nejvyšší intenzitu FL signálu. Při porovnání  $\alpha$ -CD-hydrátu : DCF v různých poměrech, jsou vyšší intenzity signálů měřené u poměrů 2:1 a 1:2 než při poměru 1:1. Poměr  $\alpha$ -CD-hydrát:  $H_2O$  vykazuje podobnou intenzitu jako  $\alpha$ -CD-hydrát: DCF 1:1, DCF v tomto poměru s CD neovlivňuje fluorescenci samotného CD. Samotná sodná sůl diklofenaku nevykazuje žádnou fluorescenci.

Pro další měření byly vytipovány komplexy  $\alpha$ -CD-hydrát : DCF 2:1 a 1:2.



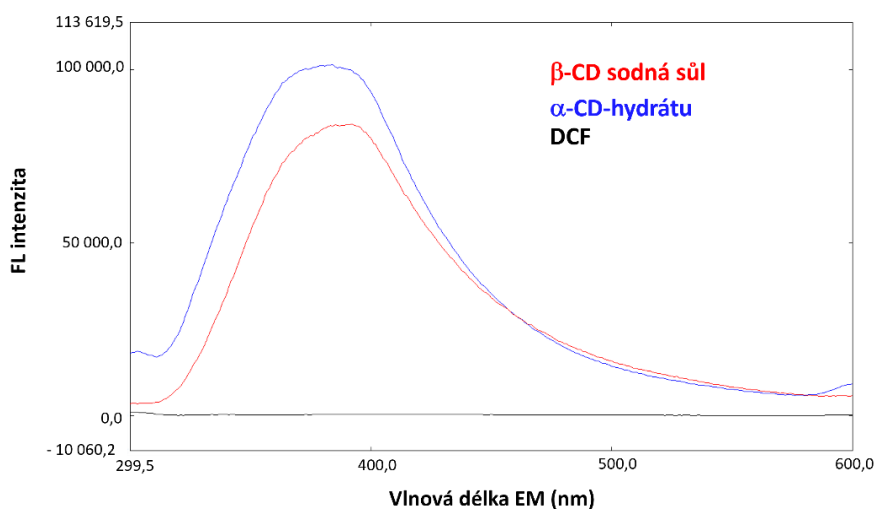
Obrázek 16: Emisní spektra  $\beta$ -CD sodná sůl proměřenou s DCF v různých poměrech a v poměru s vodou 1:1

Obrázek 16 znázorňuje proměření emisního spektra  $\beta$ -CD sodné soli, jeho komplexů v poměru s DCF (1:1, 1:2 a 2:1) a s  $H_2O$  (1:1). Samostatný  $\beta$ -CD sodné soli má nejvyšší intenzitu (kolem 80 000). U tohoto

CD mají vyšší intenzitu komplex s DCF v poměru 2:1 (intenzita 75 000) a 1:1 (intenzita 70 000) než komplex v poměru 1:2. Komplex  $\beta$ -CD sodná sůl : DCF 1:2, komplex  $\beta$ -CD sodné soli: H<sub>2</sub>O 1:1 a samotný DCF opět nevykazují žádnou fluorescenci.

## 5.2. Výběr CD za použití manuálně plněné kyvety

Následné grafy popisují testované CD, komplexy CD : DCF v různém poměru a pro porovnání i komplex CD : H<sub>2</sub>O ve stejných poměrech. Měření emisního spektra v rozsahu 300-600 nm bylo provedeno při EX vlnové délce 290 nm. Nastavení spektrofluorimetru popisuje Tabulka 5.



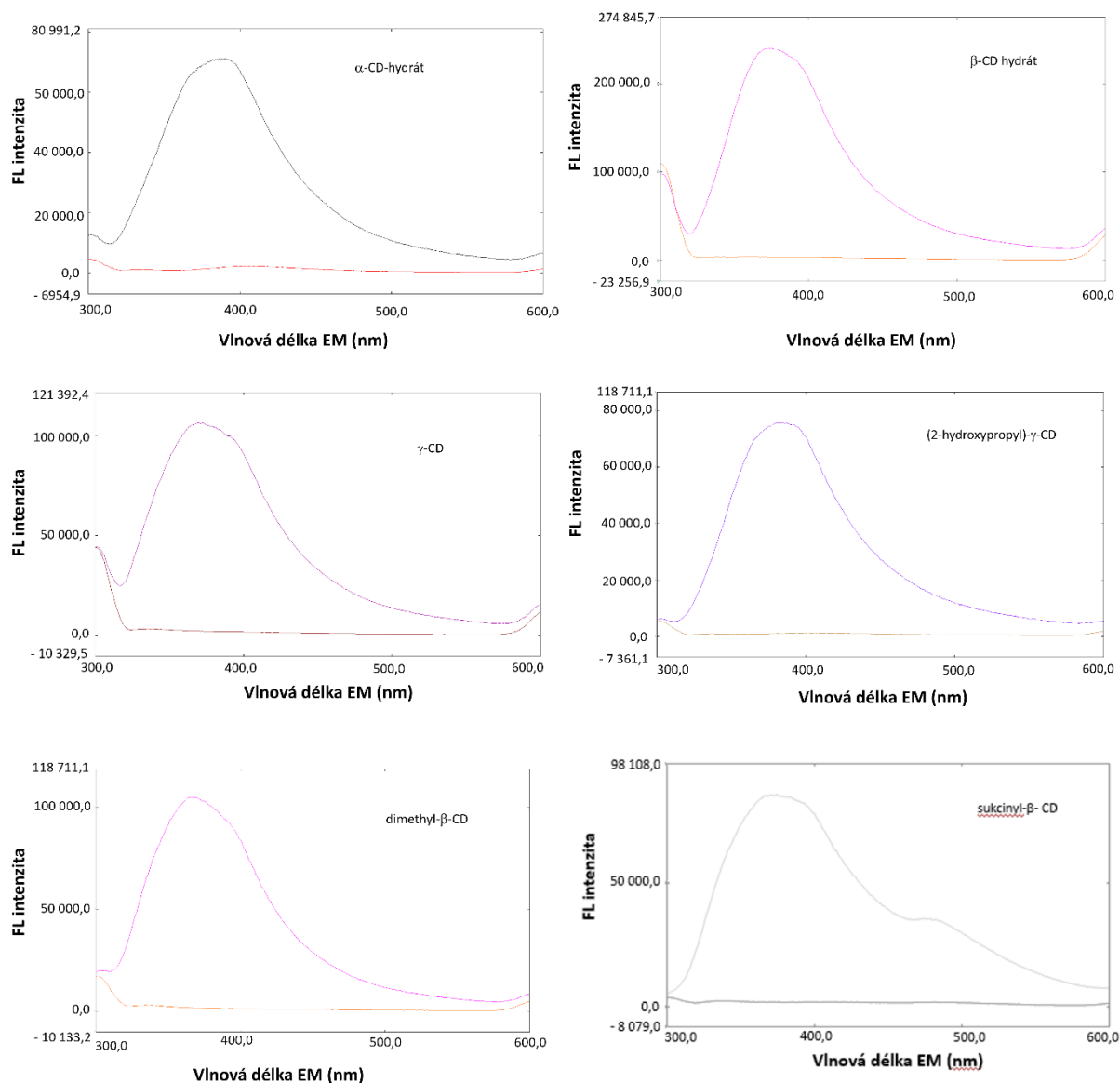
Obrázek 17: Emisní spektrum  $\alpha$ -CD-hydrátu,  $\beta$ -CD sodné soli a sodné soli DCF

Černá čára spektra na Obrázku 17 zobrazuje sodnou sůl DCF, který nevykazuje sám o sobě žádnou fluorescenci. Červené spektrum zobrazuje sodnou sůl  $\beta$ -CD, jehož maximum při 380 nm má intenzitu 80 000. Modrá čára spektra náleží  $\alpha$ -CD-hydrátu, jehož maximum při 380 nm má intenzitu 100 000.

Následující výsledky testovaných CD lze rozdělit do 4 skupin.

Do první skupiny se řadí CD, které jsou zobrazeny na Obrázku 18.

V emisním spektru tyto CD poskytují signál v komplexu s H<sub>2</sub>O v poměru 1:1, při emisní vlnové délce 380 nm. Komplex CD : DCF v poměru 1:1 neposkytuje žádný signál, komplex s DCF buď není dostatečně vytvořen nebo fluorescenci samotného CD výrazně snižuje. U dvou CD ( $\beta$ -CD hydrát,  $\gamma$ -CD) navíc komplex CD : DCF poskytl signál při emisní vlnové délce 300 nm – posun EM maxima.

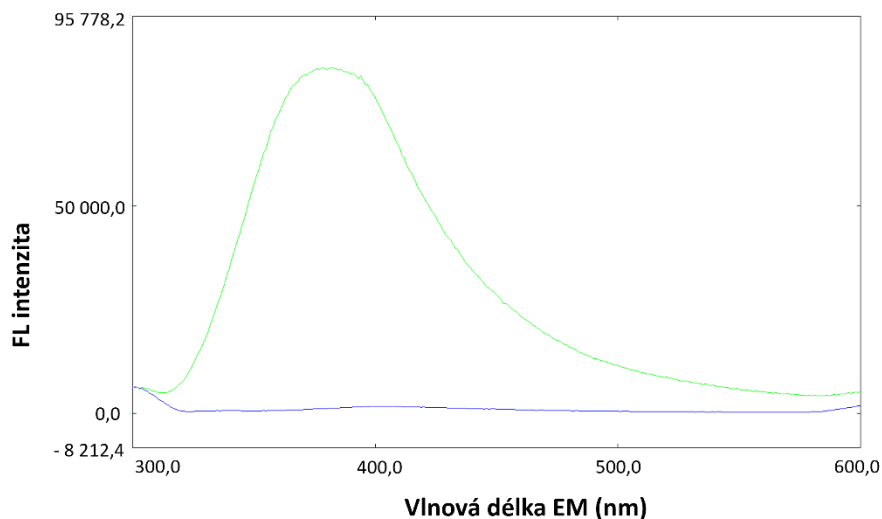


Obrázek 18: Emisní spektra komplexů CD : DCF 1:1 a CD : H<sub>2</sub>O 1:1. U všech spekter poskytuje maximum komplex CD : H<sub>2</sub>O.

Na základě změřených emisních spekter nejsou dané CD první volbou pro tvorbu komplexu s DCF a jeho následnou detekci.

Do druhé skupiny patří karboxymethyl- $\alpha$ -CD, který je zobrazen na Obrázku 19.

Z grafu je patrné, že komplex karboxymethyl- $\alpha$ -CD: H<sub>2</sub>O 1:1 nevykazuje fluorescenci, zatímco komplex karboxymethyl- $\alpha$ -CD: DCF 1:1 vykazuje maximum při emisní vlnové délce 380 nm.

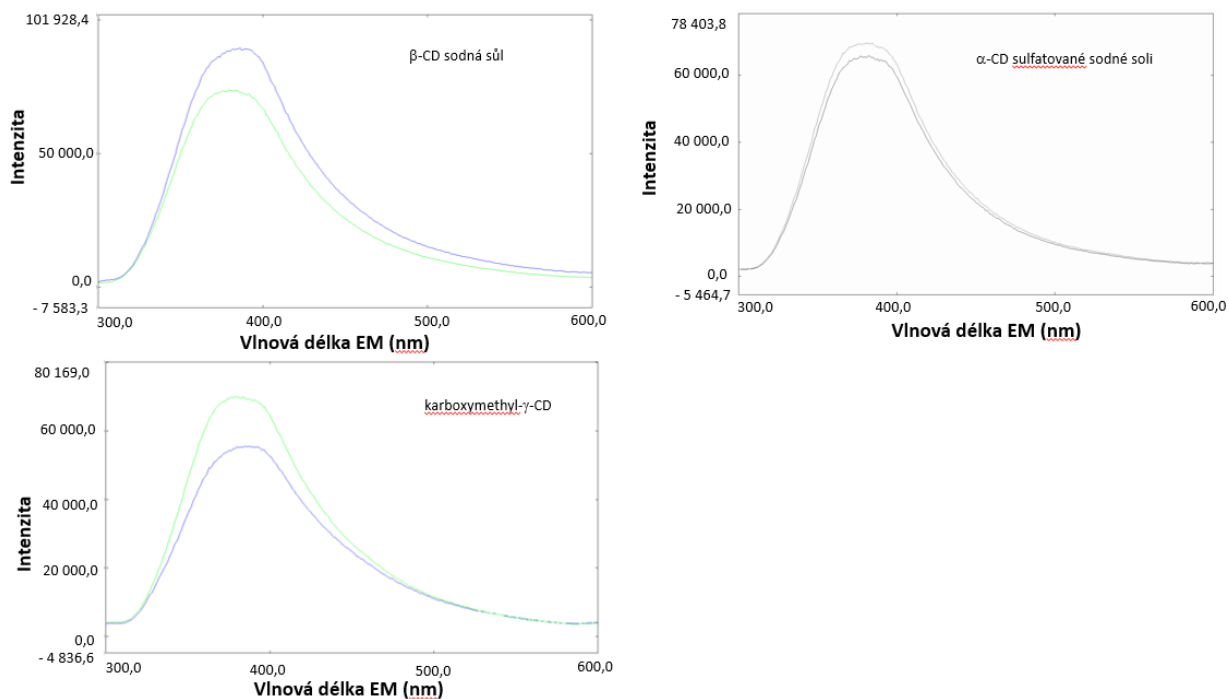


Obrázek 19: Emisní spektra zobrazující komplex karboxymethyl- $\alpha$ -CD: DCF v poměru 1:1 (maximum) a karboxymethyl- $\alpha$ -CD:  $H_2O$  v poměru 1:1

Na základě změřených emisních spekter je patrné, že karboxymethyl- $\alpha$ -CD je vhodný pro tvorbu komplexu s DCF v poměru 1:1 a jeho následnou detekci.

Do třetí skupiny se řadí CD, které jsou zobrazené na Obrázku 20.

Pro tuto skupinu je charakteristické, že komplex CD : DCF 1:1 poskytuje v emisním spektru mírně vyšší intenzitu signálu než komplex CD :  $H_2O$  1:1.

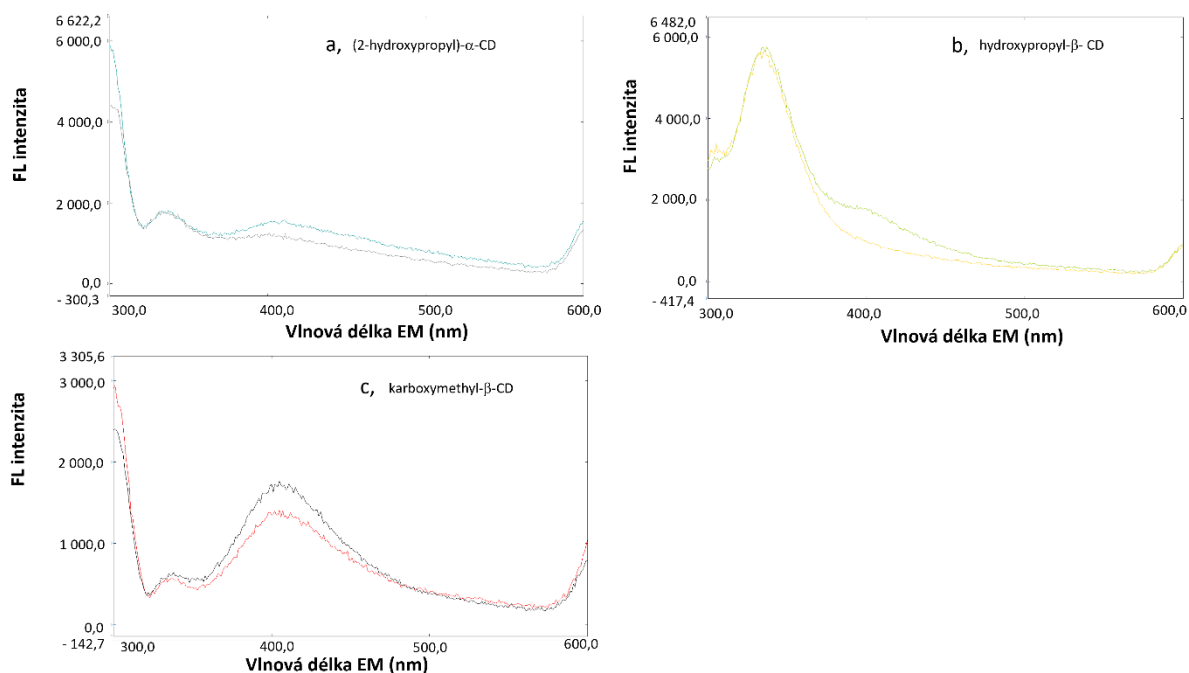


Obrázek 20: Emisní spektra komplexů CD : DCF 1:1 a CD :  $H_2O$  1:1

Na základě změřených emisních spekter by mohly být dané CD využity pro tvorbu komplexu s DCF, avšak nejsou první volbou.

Do čtvrté skupiny se řadí CD zobrazené na Obrázku 21.

U této skupiny CD je patrné, že dané komplexy nevykazují maxima při emisní vlnové délce 380 nm. Emisní spektrum je charakteristické šumem (nižší intenzita) a fluorescenčním signálem hlavně v oblasti emisní vlnové délky 300-400 nm. U měřených komplexů není patrný rozdíl při měření CD s DCF a CD s H<sub>2</sub>O. U CD (a) má vyšší intenzitu signálu komplex CD : DCF, zatímco u CD (b, c) má vyšší intenzitu signálu komplex CD : H<sub>2</sub>O.

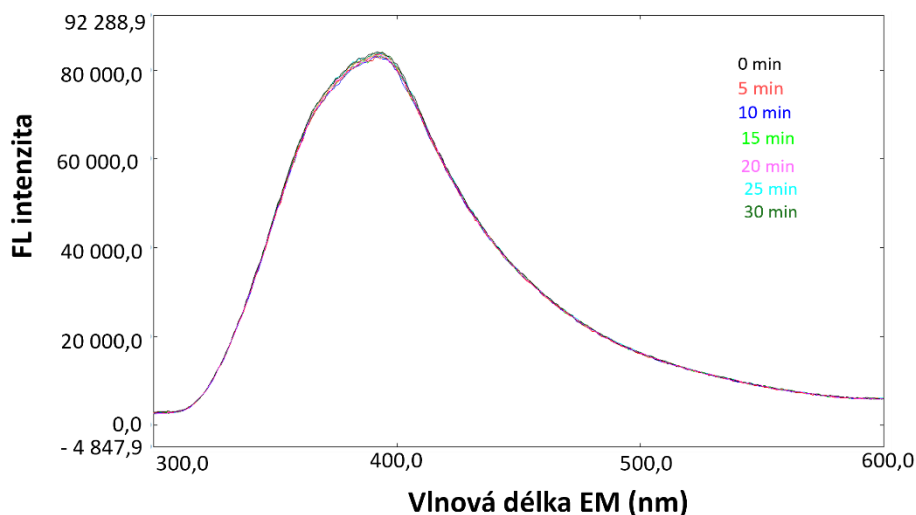


Obrázek 21: Emisní spektra komplexů CD : DCF 1:1 a CD : H<sub>2</sub>O 1:1

Na základě proměřených emisních spekter nejsou CD vhodné pro tvorbu komplexu a následnou detekci DCF.

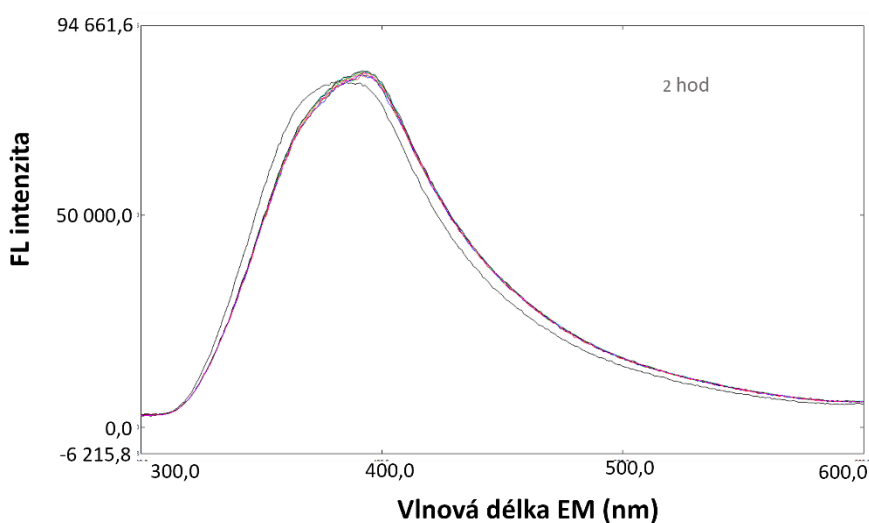
### 5.3. Stabilita vybraných komplexů CD s DCF

Stabilita vzniklých komplexů CD : DCF byla měřena v intervalu 5 min. Sledován byl nárůst nebo pokles intenzit signálů vybraných CD, přehled testovaných CD a jejich poměry jsou zaznamenány v Tabulce 6.



Obrázek 22: Stabilita emisního spektra  $\beta$ -CD sodná sůl : sodné soli DCF v poměru 1:1 v intervalu 5 minut

Obrázek 22 zobrazuje testování  $\beta$ -CD sodné soli : DCF v poměru 1:1. Měření emisních spekter komplexu započalo v čase 0 min a každých 5 min bylo měření opakováno. Takto byl komplex proměřen 7krát a jednotlivá emisní spektra byla zaznamenána do jednoho grafu.

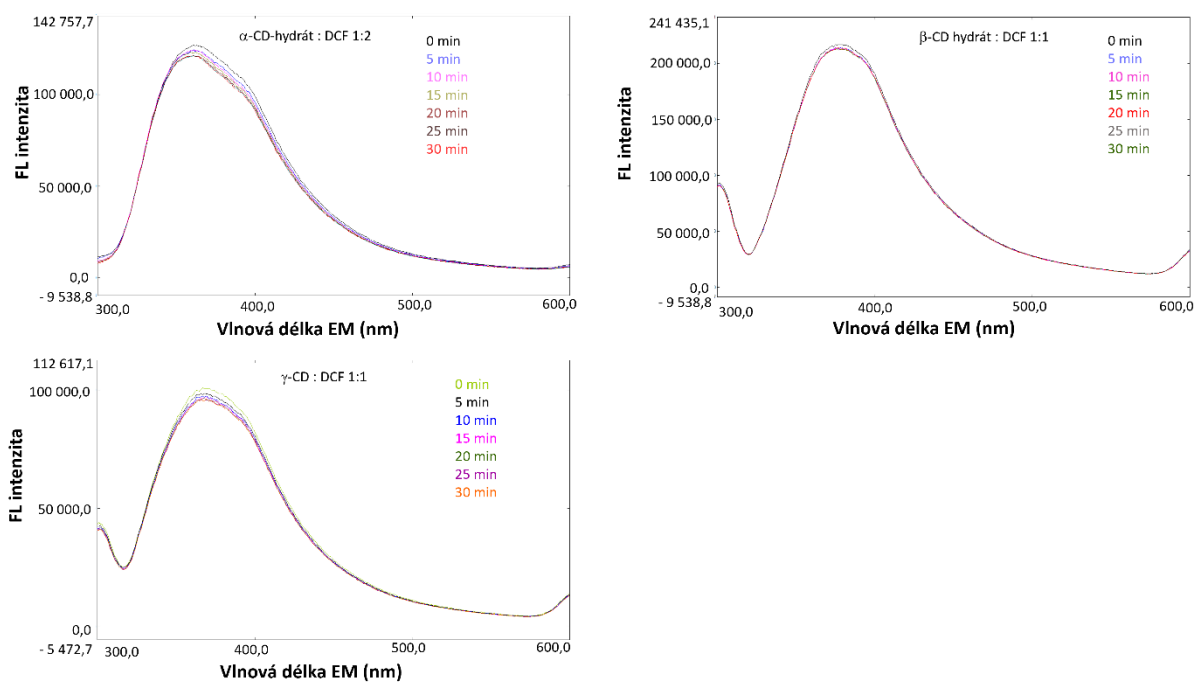


Obrázek 23: Stabilita emisního spektra  $\beta$ -CD sodná sůl : sodné soli DCF v poměru 1:1 po 2 hod od smísení

Obrázek 23 zobrazuje proměření stejného komplexu po cca 2 hodinách od prvního měření.

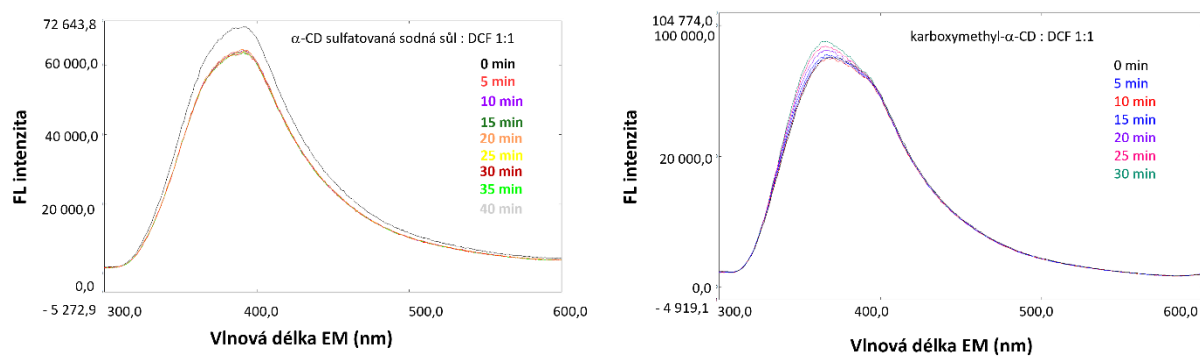
Toto měření ukázalo, že sodná sůl  $\beta$ -CD při delším čase smísení s DCF v poměru 1:1 mírně ztrácí původní fluorescenční intenzitu.

Podobné výsledky, kdy je pozorován pokles intenzity signálu vykazují  $\alpha$ -CD-hydrát : DCF 1:1,  $\beta$ -CD : DCF 1:1 a  $\gamma$ -CD : DCF 1:1. Jednotlivá emisní spektra jsou zobrazena na Obrázku 24.



Obrázek 24: Stabilita emisních spekter komplexů proměřených v intervalu 5 min a zjištění poklesu intenzity

U komplexů  $\alpha$ -CD sulfatovaná sodná sůl : DCF 1:1 a karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF 1:1 byl pozorován nárůst intenzity signálů při měření emisních spekter v intervalu 5 minut. Obrázek 25 zobrazuje jednotlivá měření komplexů.

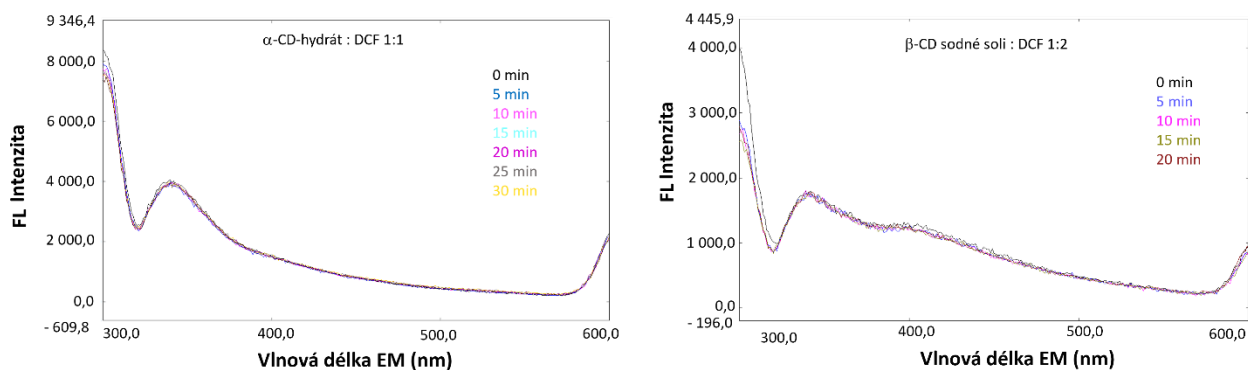


Obrázek 25: Stabilita emisních spekter komplexů proměřených v intervalu 5 min a zjištění nárůstu intenzity

Na základě proměřených emisních spekter byl pozorován nárůst intenzit signálů u komplexu  $\alpha$ -CD sulfatovaná sodná sůl : DCF 1:1 o přibližně 14,5 % za 40 min a u komplexu karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF 1:1 o přibližně 5,9 % za 30 min.

U komplexů  $\beta$ -CD sodné soli : DCF 1:2 a  $\alpha$ -CD-hydrát : DCF 1:1 není pozorovatelný signál při EM 380 nm. Tato spektra popisuje Obrázek 26.





Obrázek 26: Stabilita emisních spekter komplexů proměřených v intervalu 5 min

Na základě změřených výsledků u těchto dvou komplexů lze usoudit, že tyto poměry nejsou vhodné pro tvorbu a následnou detekci komplexu.

## 5.4. Podmínky měření v SIA systému

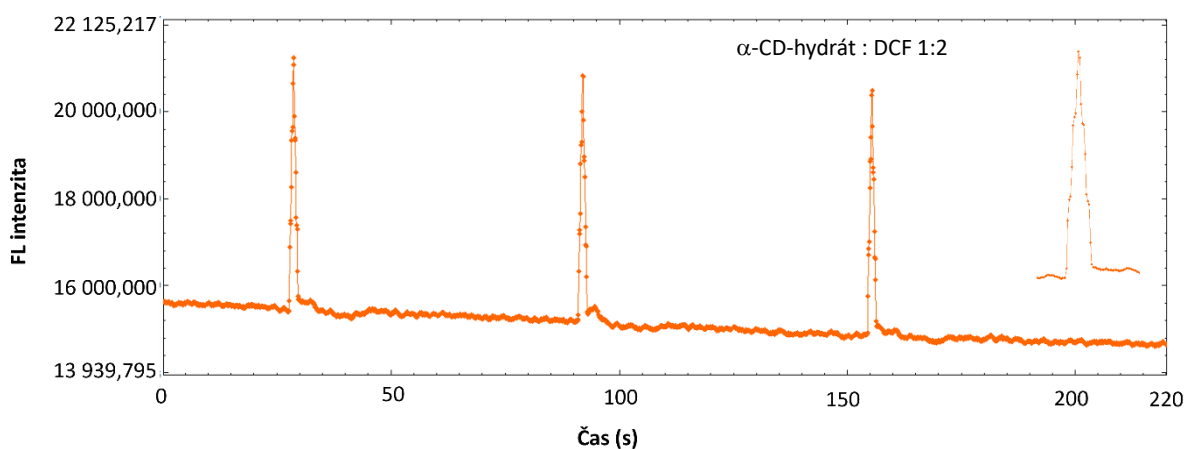
Nastavení spektrofluorimetru popisuje Tabulka 6, pro všechny SIA měření byla využita průtoková fluorimetrická kyveta.

V SIA systému byly testovány: „accumulation time“, průtoková rychlost a různé ovládací programy popsané v experimentální části práce.

### 5.4.1. „Accumulation time“

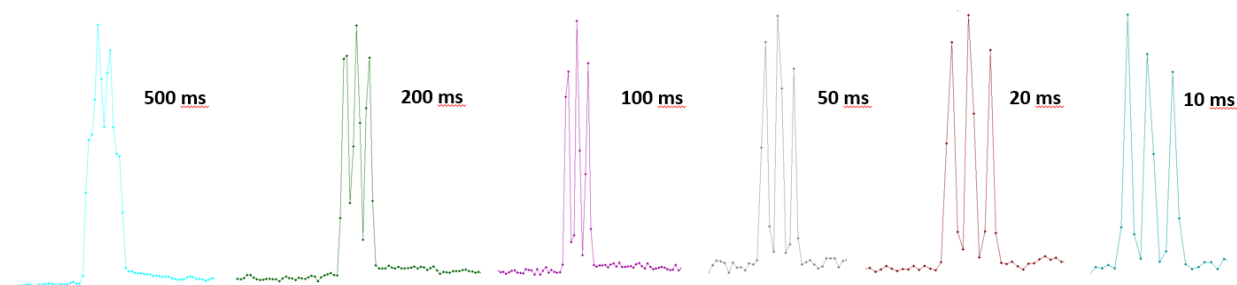
Úvodní testování v SIA systému bylo provedeno pro zjištění vhodného „accumulation time“ a vhodné průtokové rychlosti. Testován byl komplex  $\alpha$ -CD-hydrát : DCF 1:2.

Obrázek 27 zobrazuje proměření komplexu  $\alpha$ -CD-hydrát : DCF 1:2 při nastavení „accumulation time“ 1 s.



Obrázek 27: Záznam měření komplexu  $\alpha$ -CD-hydrát : DCF 1:2 při „accumulation time“ 1 s v SIA systému a jeho zvětšený tvar píku

Stejným způsobem byly proměřeny i časy 500 ms, 200 ms, 100 ms, 50 ms, 20 ms a 10 ms. Spektra byla podobná jako na Obrázku 27. Jednotlivá měření se od sebe lišila tím, že vrcholky píků byly různě rozštěpeny, Obrázek 28.



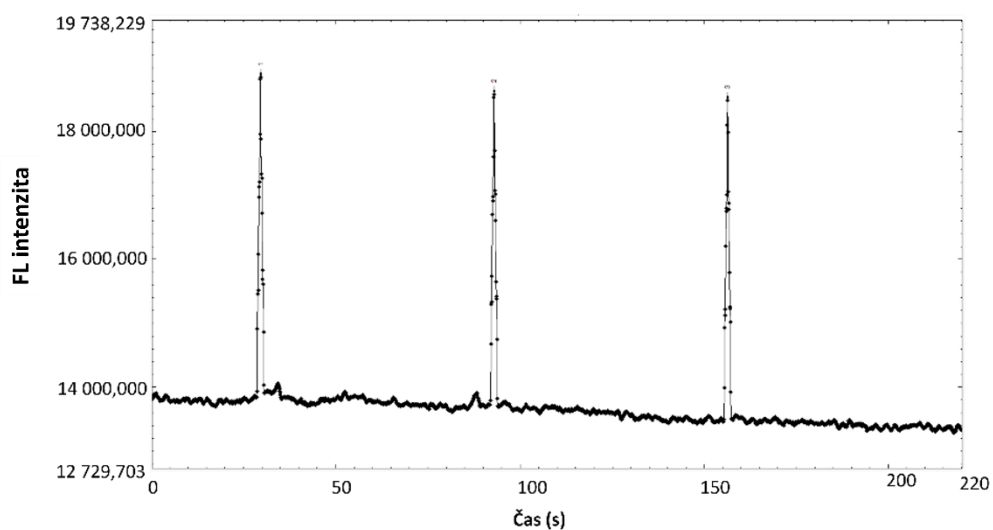
Obrázek 28: Zvětšení píků komplexu  $\alpha$ -CD-hydrát : DCF 1:2 při různých „accumulation time“

Na základě výsledných spekter (Obrázek 27 a Obrázek 28) byl zvolen pro další měření „accumulation time“ 1 s, protože po přiblížení záznamu, nedošlo k rozštěpení signálu v maximu píků.

#### 5.4.2. Průtoková rychlost

Byla testována průtoková rychlost u komplexu  $\alpha$ -CD-hydrát : DCF 1:2 (50  $\mu$ l/s, 40  $\mu$ l/s, 30  $\mu$ l/s, 25  $\mu$ l/s, 20  $\mu$ l/s, 15  $\mu$ l/s).

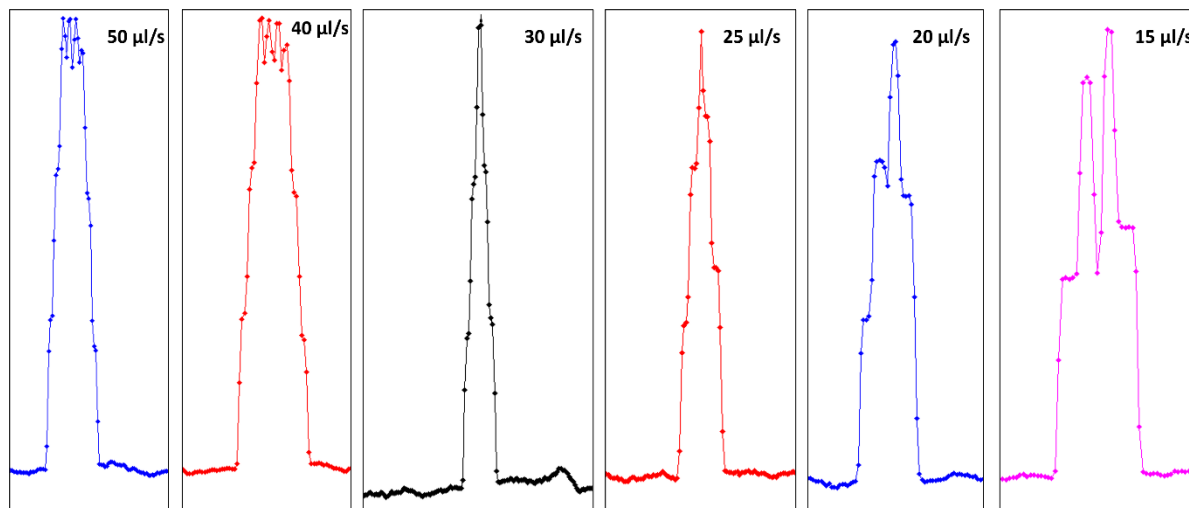
Obrázek 29 slouží jako modelový pro měření průtokových rychlostí, zobrazuje fluorescenční měření s využitím SIA systému při průtokové rychlosti 30  $\mu$ l/s. Ostatní průtokové rychlosti poskytly podobný záznam, jako je možné vidět na Obrázku 29. Dále jsou zobrazeny pouze jednotlivé píky pro lepší porovnání jejich tvaru a symetrie.



Obrázek 29: Záznam měření komplexu  $\alpha$ -CD-hydrát : DCF 1:2 při průtokové rychlosti 30  $\mu$ l/s

Na základě změřených záznamů bylo třeba posoudit u každé proměřené průtokové rychlosti tvar píků a jejich případné rozštěpení (efektivitu promísení obou reagujících aspirovaných roztoků).

Jednotlivé přibližné píky jsou zobrazeny na Obrázku 30.



Obrázek 30: Přehled zvětšených píků pro jednotlivé průtokové rychlosti u komplexu  $\alpha$ -CD-hydrát : DCF 1:2

Na základě porovnání jednotlivých píků (Obrázek 30) byla pro další měření vybrána průtoková rychlost 30  $\mu$ l/s.

### 5.4.3. SIA ovládací programy pro různé CD

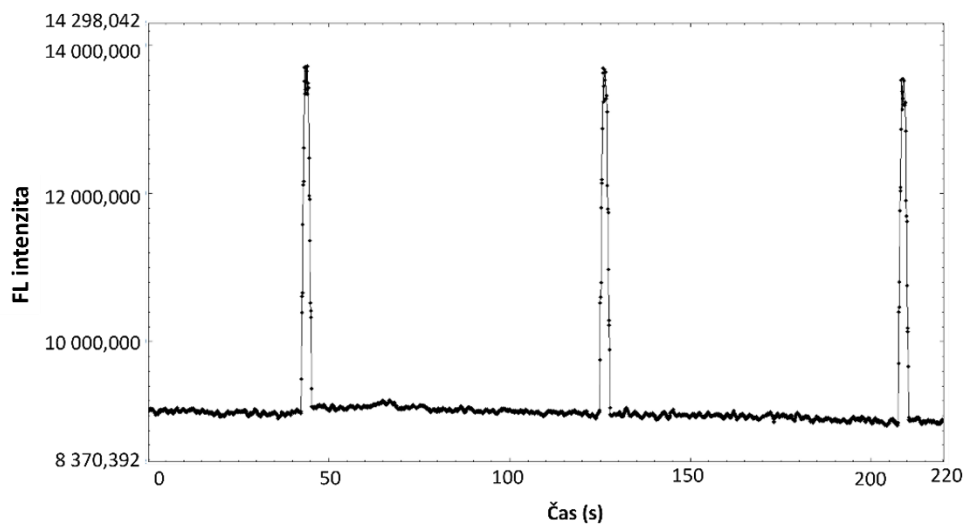
Základní testování probíhalo pomocí aspirace zón DCF a CD a jejich detekce (program 1), aspirace už smíšených roztoků DCF a CD (program 2), promísení obou zón změnou směru toku nosného proudu (program 3), zastavení v mísící cívce (program 4) a kombinace promísení a zastavení (program 5). Pro porovnání byly za stejných podmínek měřeny i slepé pokusy v kombinaci CD s vodou pro dodržení stejných podmínek mísení aspirovaných zón v SIA systému. Pro testování byly zvoleny 3 typy CD:  $\alpha$ -CD-hydrát, karboxymethyl- $\alpha$ -CD a (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD.

#### 5.4.3.1. $\alpha$ -CD-hydrát

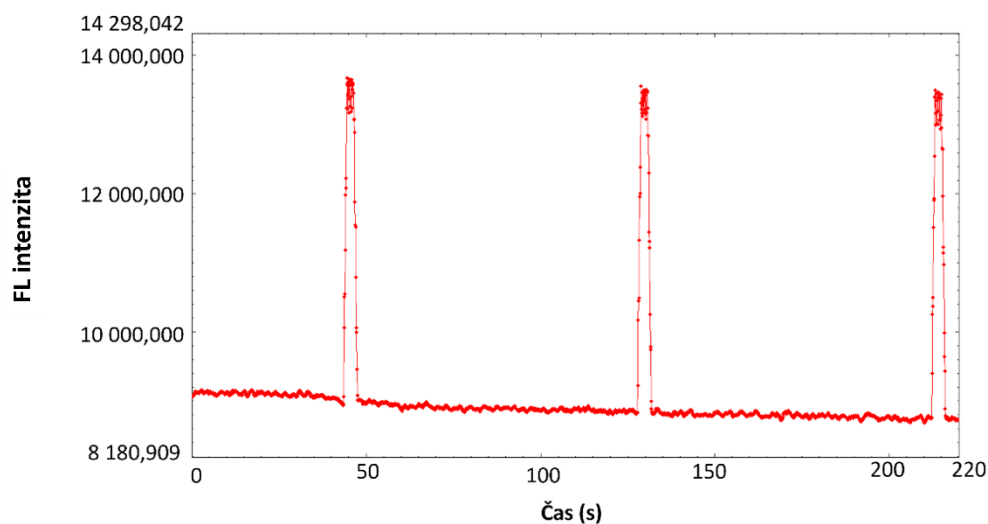
Tento CD byl testován podle předchozí rešerše odborné literatury [8]. Přehled a podmínky měření popisuje Tabulka 8.

Testování bylo prováděno za využití ovládacího programu 4 a programu 2.

Nejprve byl proměřen komplex  $\alpha$ -CD-hydrát : H<sub>2</sub>O 1:1 (Obrázek 31) a následně komplex  $\alpha$ -CD-hydrát : DCF 1:2 (Obrázek 32).



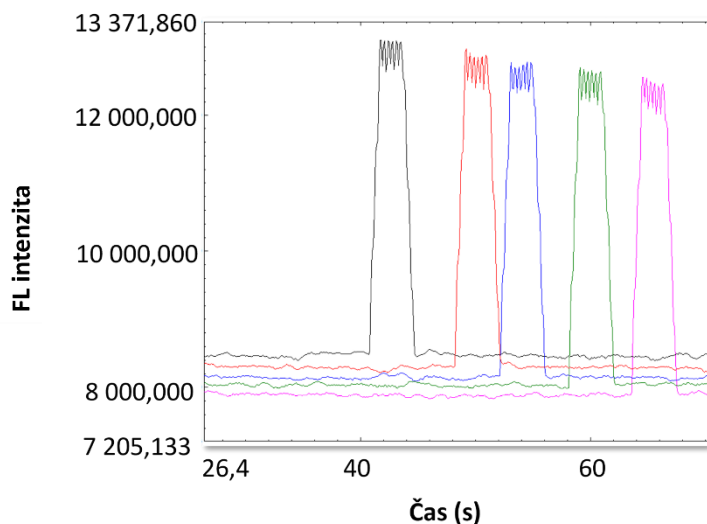
Obrázek 31: Záznam měření  $\alpha$ -CD-hydrát : H<sub>2</sub>O 1:1, ovládací program 4, čas zastavení v mísící cívce 10 s a průtoková rychlost 30  $\mu$ l/s



Obrázek 32: Záznam měření  $\alpha$ -CD-hydrát : DCF 1:2, ovládací program 4, čas zastavení v mísící cívce 10 s a průtoková rychlost 30  $\mu$ l/s

Z naměřených záznamů (Obrázek 31 a Obrázek 32) je patrné, že komplex CD s DCF a komplex CD s H<sub>2</sub>O vykazují stejnou naměřenou FL intenzitu a podmínky měření tedy neumožňují rozlišit tvorbu komplexu DCF s testovaným CD od slepého pokusu.

Dále bylo testováno zastavení reagujících zón v mísící cívce při měření komplexu  $\alpha$ -CD-hydrátu : DCF 1:2 za využití programu 4 s časem zastavení 10/15/20/25/30 s (Obrázek 33).



Obrázek 33: Záznam jednotlivých měření  $\alpha$ -CD-hydrátu : DCF 1:2 při různém času zastavení v mísící cívce 10/15/20/25/30 s (na obrázku jsou časy řazeny vzestupně zleva doprava)

Ze záznamu měření (Obrázek 33) je patrné, že testované zastavení v mísící cívce nemá vliv na výsledný tvar píku, který je stále rozštěpený.

Proto pro další měření tento CD nebyl využit.

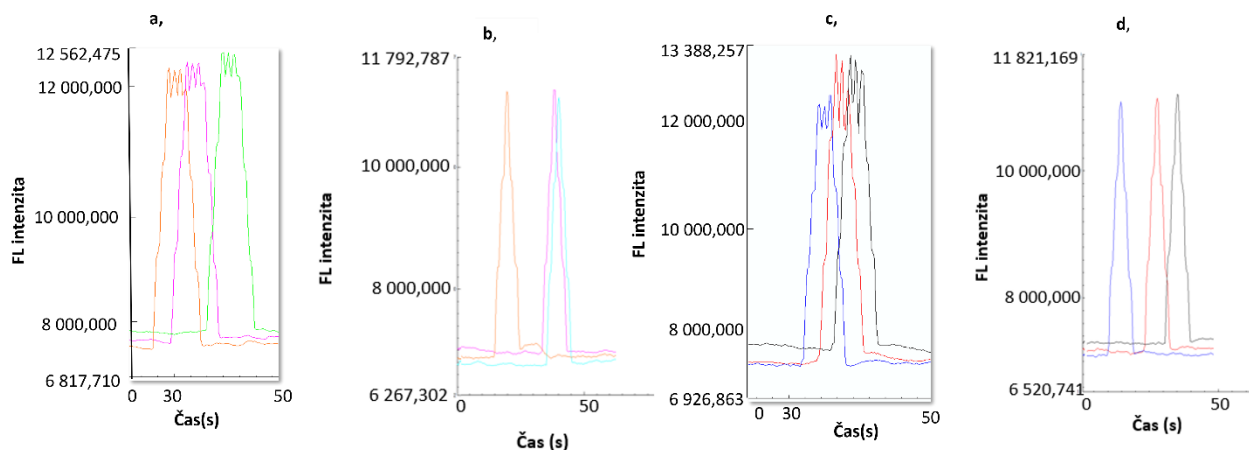
#### 5.4.3.2. Karboxymethyl- $\alpha$ -CD

Následně bylo provedeno podrobné testování karboxymethyl- $\alpha$ -CD, který byl vybrán v závislosti na předchozích měřeních s manuálně plněnou fluorimetrickou kyvetou.

Přehled a podmínky měření popisuje Tabulka 9.

Bylo provedeno měření komplexu karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF 1:1 (Obrázek 34 a, b,), jehož záznam byl porovnán s komplexem karboxymethyl- $\alpha$ -CD : H<sub>2</sub>O 1:1 za stejných podmínek měření (Obrázek 34 c, d,).

Proměřeny byly průtokové rychlosti 30/40/50  $\mu$ l/s, byly použity ovládací programy 1 a 2.



Obrázek 34: Souhrn záznamů měření:

a, komplexu karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF 1:1 při průtokových rychlostí 30/40/50  $\mu$ l/s, ovládací program 1

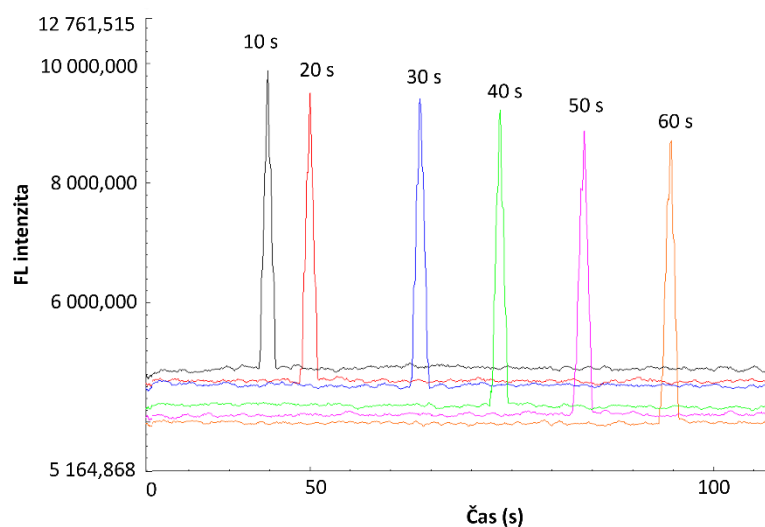
b, komplexu karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF 1:1 s průtokovou rychlostí 30/40/50  $\mu$ l/s, ovládací program 2

c, komplexu karboxymethyl- $\alpha$ -CD : H<sub>2</sub>O 1:1 při průtokových rychlostí 30/40/50  $\mu$ l/s, ovládací program 1

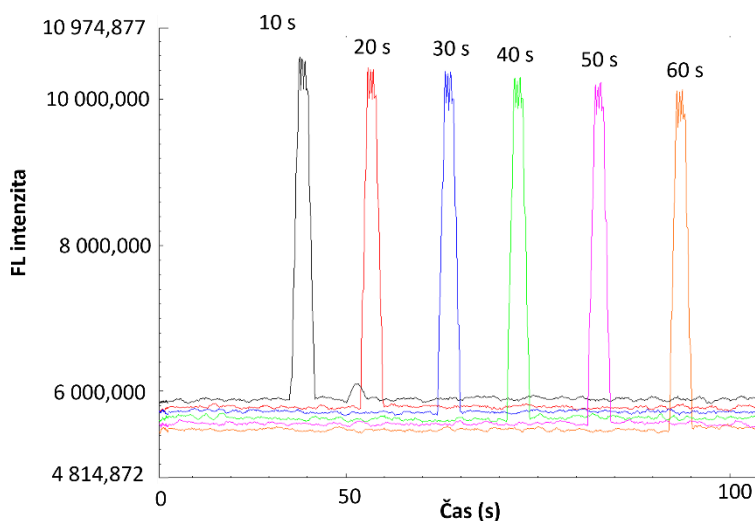
d, komplexu karboxymethyl- $\alpha$ -CD : H<sub>2</sub>O 1:1 s průtokovou rychlostí 30/40/50  $\mu$ l/s, ovládací program 2

Při využití ovládacího programu 2 nebyly mezi záznamy změřenými s různými průtokovými rychlostmi nalezeny rozdíly. Z naměřených záznamů (Obrázky 34 b, d,) je patrné, že pro měření je výhodnější zvolit ovládací program 2 kvůli tvaru výsledných píků (oproti ovládacímu programu 1). Opět nebyl nalezen významný rozdíl mezi měřeným a slepým pokusem, který není způsoben efektivitou mísení v SIA systému, protože v obou ovládacích programech jsou získány podobné FL intenzity, resp. vyšší hodnoty byly pozorovány při promísení v SIA systému.

Dále byl testován ovládací program 4. Byly proměřeny časy zastavení v mísící cívce 10/20/30/40 a 50 s. Testovány byly komplexy karboxymethyl- $\alpha$ -CD : H<sub>2</sub>O 1:1 (Obrázek 35) a karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF 1:1 (Obrázek 36).



Obrázek 35: Záznam měření komplexu karboxymethyl- $\alpha$ -CD : H<sub>2</sub>O 1:1 při čase zastavení 10/20/30/40/50/60 s, ovládací program 4



Obrázek 36: Záznam měření komplexu karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF 1:1 při čase zastavení 10/20/30/40/50/60 s, ovládací program 4

Ze záznamů zobrazených na Obrázku 35 a Obrázku 36 je patrné, že dochází u komplexu karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF 1:1 ke štěpení vrcholku píků, přičemž je při měření s DCF patrné mírné zvýšení FL signálu. Různá doba zastavení aspirovaných roztoků v mísící cívce SIA systému nemá vliv na tvar ani výšku píků.

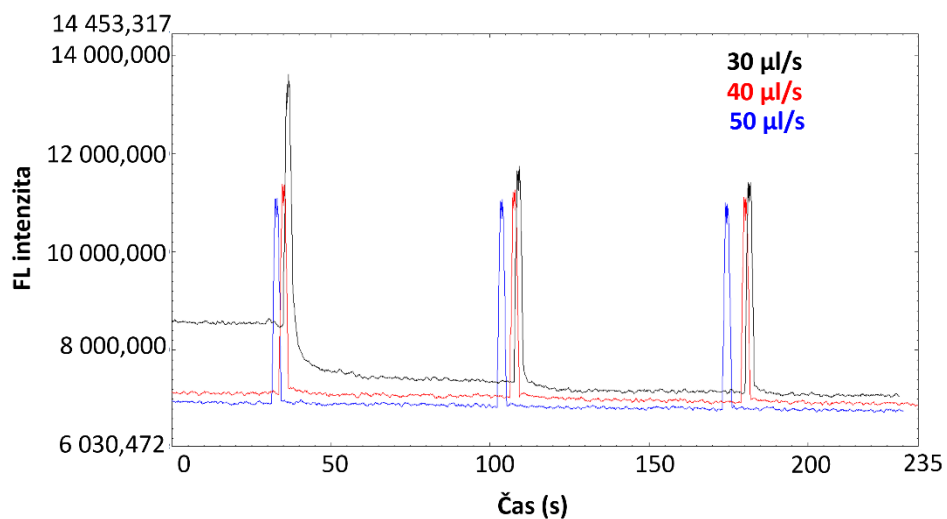
#### 5.4.3.3. (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD

Následně bylo provedeno testování (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD, který sice původně nebyl vybrán v závislosti na předchozích měřeních s manuálně plněnou fluorimetrickou kyvetou, ale pro další měření byl zvolen kvůli jeho vlivu na fluorescenci v komplexu s DCF (i když v předchozích měření byla patrná nižší FL intenzita komplexu v porovnání se slepým pokusem).

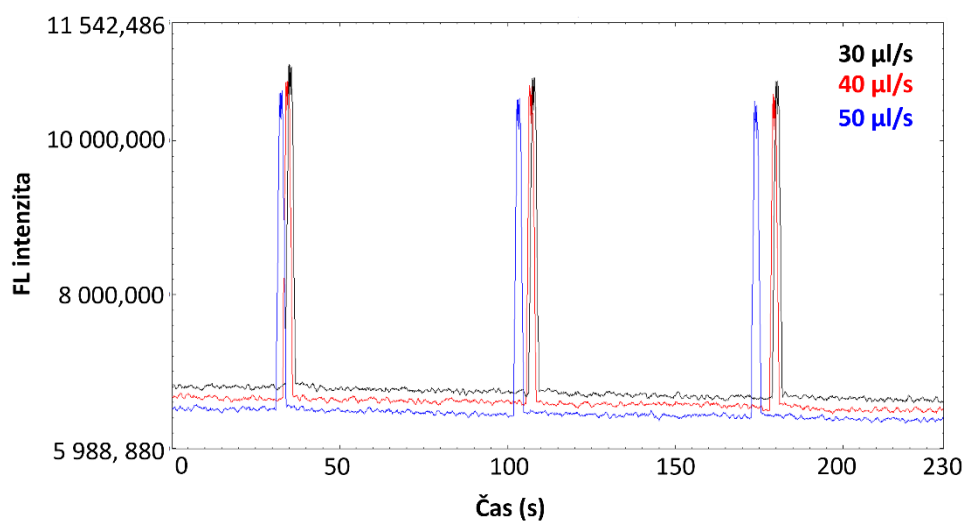
Přehled a podmínky měření popisuje Tabulka 10.

Bylo provedeno měření s komplexem (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : DCF 1:1 (Obrázky 38, 40) a (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : H<sub>2</sub>O 1:1 (Obrázky 37, 39). Pro tato měření byly využity ovládací programy 1 a 2.

Proměřen byl (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : H<sub>2</sub>O 1:1 při průtokových rychlostech 30/40/50  $\mu$ l/s.

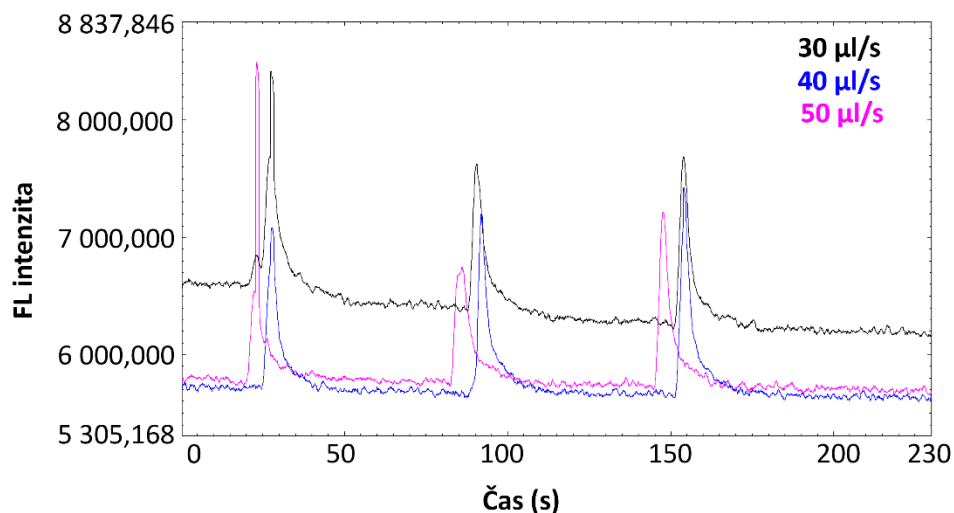


Obrázek 37: Záznam měření komplexu (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : H<sub>2</sub>O 1:1 s průtokovou rychlostí 30/40/50  $\mu$ l/s, ovládací program 1

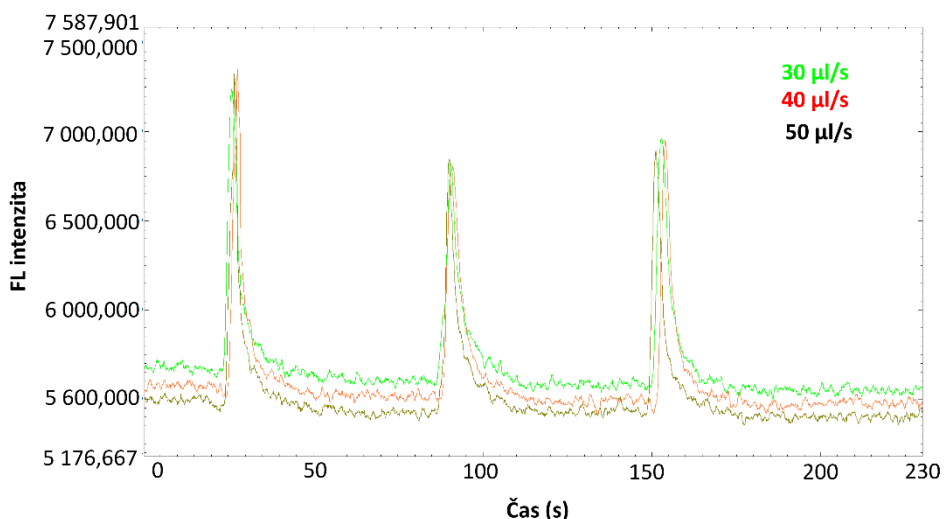


Obrázek 38: Záznam měření komplexu (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : DCF 1:1 s průtokovou rychlostí 30/40/50  $\mu$ l/s, ovládací program 1





Obrázek 39: Záznam měření komplexu (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : H<sub>2</sub>O 1:1 s průtokovou rychlostí 30/40/50  $\mu$ l/s, ovládací program 2



Obrázek 40: Záznam měření komplexu (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : DCF 1:1 s průtokovou rychlostí 30/40/50  $\mu$ l/s, ovládací program 2

Při porovnání záznamu měření (Obrázek 37 a 38) se intenzita proměřených komplexů liší.

FL intenzita komplexu CD : H<sub>2</sub>O vykazuje vyšší FL signál (přibližně 4411,7) než komplex CD : DCF (přibližně 4170,7). Jednotlivé píky při tomto měření za použití programu 1 mají rozštěpený vrchol, je proto vhodné zvolit jiný ovládací program SIA systému, případně i jiné podmínky měření.

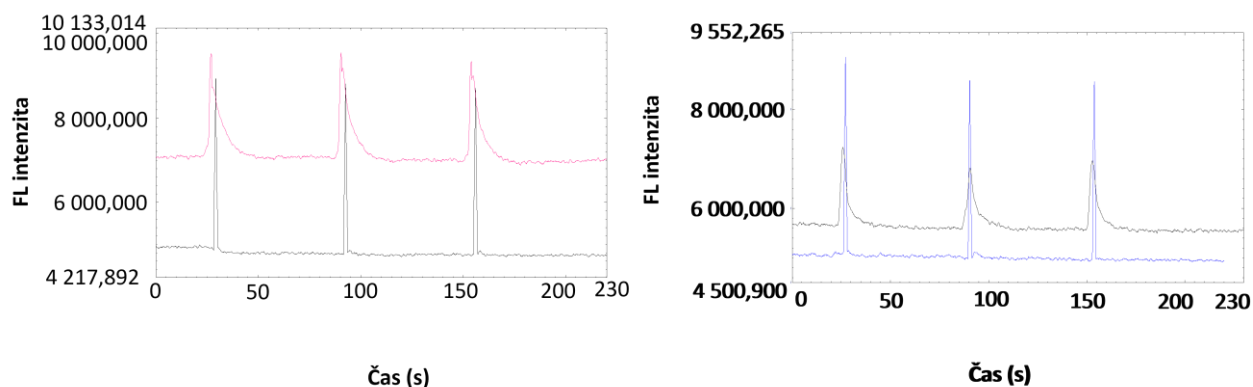
Ze záznamu měření (Obrázek 39 a 40) je zřejmé, že píky nemají členěný vrchol a celkově dosahují nižší FL intenzity signálů, která se pohybuje pro slepý pokus přibližně 1790 a pro komplex CD : DCF kolem 1500.

#### 5.4.4. Měření po 24 hod

Měřeny byly komplexy karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF 1:1 a (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : DCF 1:1. Roztoky byly uskladněny za laboratorní teploty a po 24 hod znovu proměřeny pomocí ovládacího programu 2.

Přehled měření popisuje Tabulka 11.

Na Obrázku 41 jsou zobrazeny záznamy karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF 1:1 a (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : DCF 1:1 při měření hned po smísení komplexu a při ponechání komplexu reagovat 24 hod a následném měření.



Obrázek 41: Záznam měření (vlevo) karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF 1:1 měřeného v čas přípravy (růžová barva) a karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF 1:1 měřeného po 24 hod (černá barva). Záznam měření (vpravo) (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : DCF 1:1 měřeného v čas přípravy (černá barva) a (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : DCF 1:1 měřeného po 24 hod (modrá barva).

Toto měření ukázalo, že pro dosažení lepších výsledků (vyšší FL intenzita, lepší tvar píku) u měření komplexů karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF 1:1 a (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : DCF 1:1 je třeba komplex nechat delší dobu reagovat za laboratorní teploty a až poté změřit.

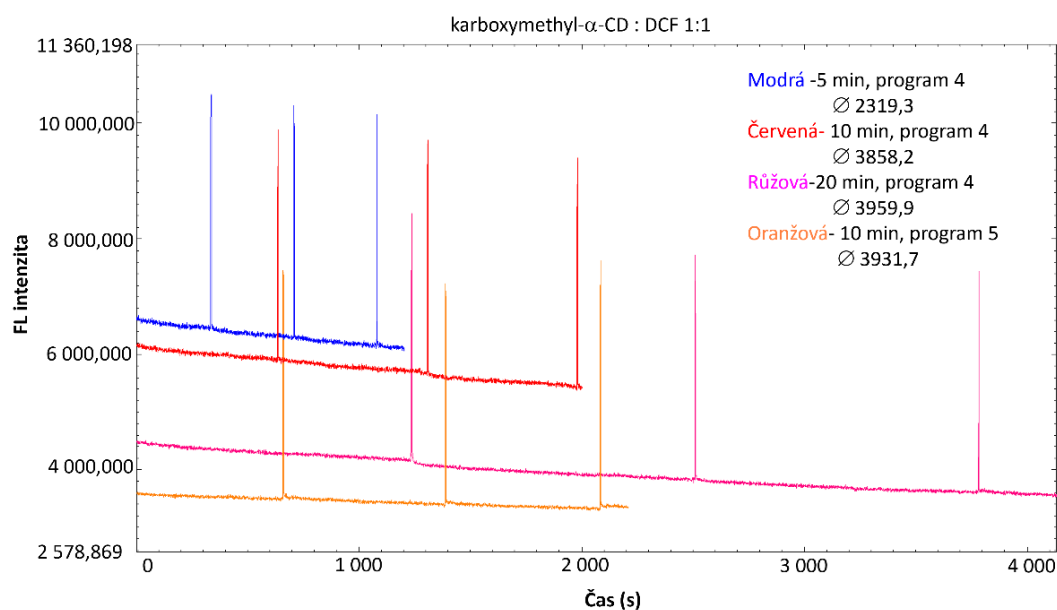
Po výsledcích z měření byly pro další testování zvoleny jiné ovládací programy, a to program 4 a program 5.

#### 5.4.5. Měření při zastavení toku v mísící cívce

Přehled a podmínky měření jsou popsány v Tabulce 12 a Tabulce 13.

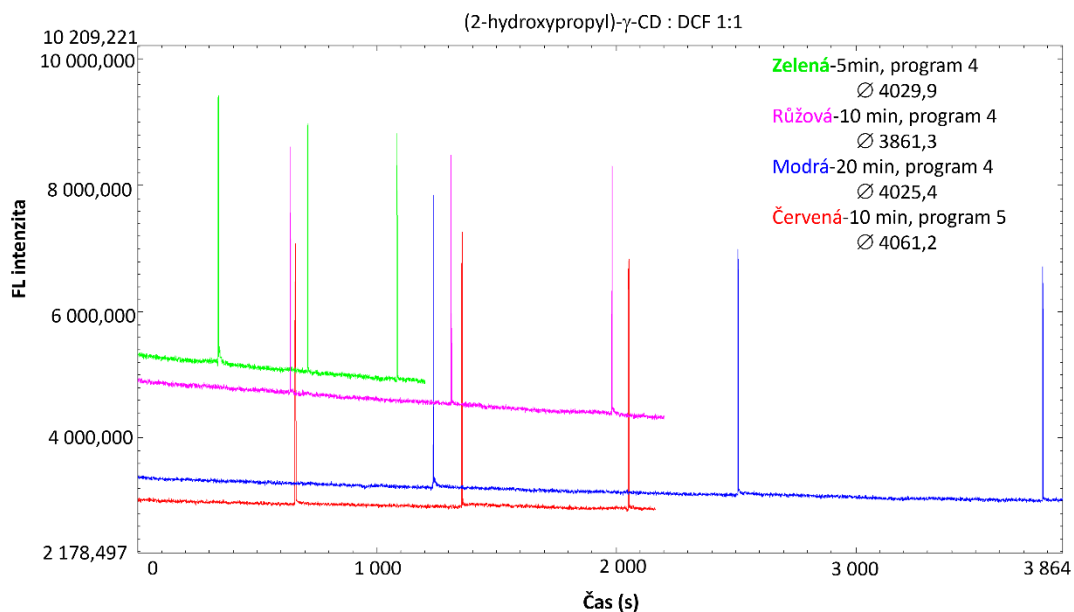
Samotný program 3 nebyl využíván pro další měření, protože při testování tohoto programu u  $\alpha$ -CD hydrátu docházelo při různé průtokové rychlosti ke značnému rozštěpení vrcholů píků a ke změnám jejich tvaru. Proto byl přidán krok zastavení při samotné aspiraci a při opakovaném promísení změnou směru toku nosného proudu (program 4 a program 5).

Na Obrázku 42 je zobrazeno měření karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF 1:1 za využití ovládacího programu 4 a programu 5, při čase zastavení 5, 10 nebo 20 min. U každého měření je uvedena průměrná intenzita FL signálu.



Obrázek 42: Souhrn záznamů měření komplexu karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF 1:1 za využití ovládacího programu 4 nebo 5 s průměrnou intenzitou FL signálu

Ze záznamů měření (Obrázek 42) je patrné, že při měření s programem 4 intenzita píků roste s rostoucím časem zastavení. Při měření s programem 5 došlo k mírnému nárůstu FL intenzity. Po odečtení FL intenzit jednotlivých signálů a základní line na ose y, vykazoval nejvyšší FL intenzitu záznam s využitím programu 5 a dobou zastavení 10 min. Průměrná intenzita FL signálů při využití programu 4 byla 3335,6 a u programu 5 byla 3931,7. Jejich rozdíl ve FL intenzitě se lišil o 14,0 %. Stejný experiment byl zopakován i pro (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : DCF 1:1 (Obrázek 43).



Obrázek 43: Souhrn grafů spekter komplexu (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : DCF 1:1 za využití ovládacího programu 4 nebo 5 SIA systému s průměrnou intenzitou FL signálu

V tomto případě došlo opět ke snížení intenzit FL signálů u obou ovládacích programů 4 i 5. I u tohoto CD došlo při měření s programem 5 a dobou zastavení 10 min k naměření vyšších intenzit FL signálů jednotlivých píků. Průměrná FL intenzita signálů u programu 4 byla 3972,2 a u programu 5 byla 4061,2. Rozdíl ve FL intenzitě signálů mezi programem 4 a 5 se lišil přibližně o 2,3 %.

V závislosti na výsledcích měření ovládacích programů (1-5) byly zvoleny následující podmínky pro další měření:

Pro kalibrační závislost byl zvolen ovládací program 5. Jeho hlavní výhodou oproti ostatním programům bylo, že současně umožňoval promísení testovaných roztoků mezi sebou a jejich následné zastavení (tvorba komplexu) v SIA systému.

Program 1 - rozštěpené vrcholky píků

Program 2 - nízká FL intenzita signálů

Program 3 - rozdílné tvary píků v rámci jednoho měření (stejná průtoková rychlost) a rozštěpené vrcholky píků

Program 4 – nižší FL intenzita signálů

Byl vybrán (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD (4061,2) u kterého byla získána vyšší intenzita FL signálu než u karboxymethyl- $\alpha$ -CD (3931,7), měřené programem 5.

## 5.5. Kalibrační závislost

Lineární závislost stanovení DCF byla testována ve dvou prostředích, a to ve vodném roztoku, a v kultivačním médiu. Použit byl ovládací program 5 u všech měření. Pro toto měření byl zvolen (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD. Analýza u každého vzorku byla prováděna třikrát. Následně byly odečteny intenzity FL signálů a jejich průměry byly zaznamenány do tabulek, ze kterých byly vytvořeny grafy závislosti intenzity FL signálů na koncentraci DCF. Výsledné hodnoty byly v grafu proloženy lineární spojnici trendu.

### 5.5.1. Měření kalibrační závislosti ve vodě

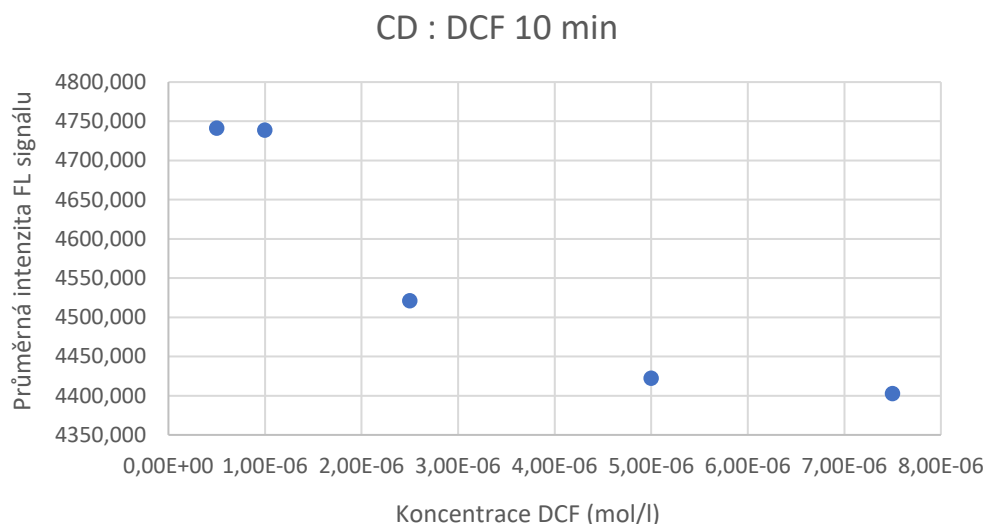
Měření probíhala se zastavením v mísící cívce po dobu 10 min a 1 min.

Přehled a podmínky měření jsou popsány v Tabulce 14.

Tabulka 18 zobrazuje výsledky měření (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : DCF 1:1 při době zastavení 10 min v mísící cívce.

Tabulka 18: Přehled měření (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD ( $1 \times 10^{-2}$  mol/l) : DCF 1:1

Koncentrace CD ( $1 \times 10^{-2}$ mol/l), 10 min				
Koncentrace DCF (mol/l)	Intenzita FL signálu	Průměr FL signálu	SD	RSD (%)
$5 \times 10^{-7}$	4765,0	4741,0	96,0	2,03
	4635,3			
	4822,8			
$1 \times 10^{-6}$	5310,7	4738,4	501,0	10,57
	4525,4			
	4379,0			
$2,5 \times 10^{-6}$	4266,9	4520,8	401,2	8,88
	4312,2			
	4983,4			
$5 \times 10^{-6}$	4488,3	4422,3	73,4	1,66
	4343,3			
	4435,2			
$7,5 \times 10^{-6}$	4261,7	4402,4	122,4	2,78
	4461,6			
	4484,0			



Obrázek 44: Kalibrační křivka (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : DCF ve vodném prostředí a časem zastavení 10 min

Z grafu (Obrázek 44) je patrné, že se snižující koncentrací DCF se zvyšuje intenzita FL signálu (což zapříčinilo měření roztoků připravených hned před měřením, viz. další výsledky).

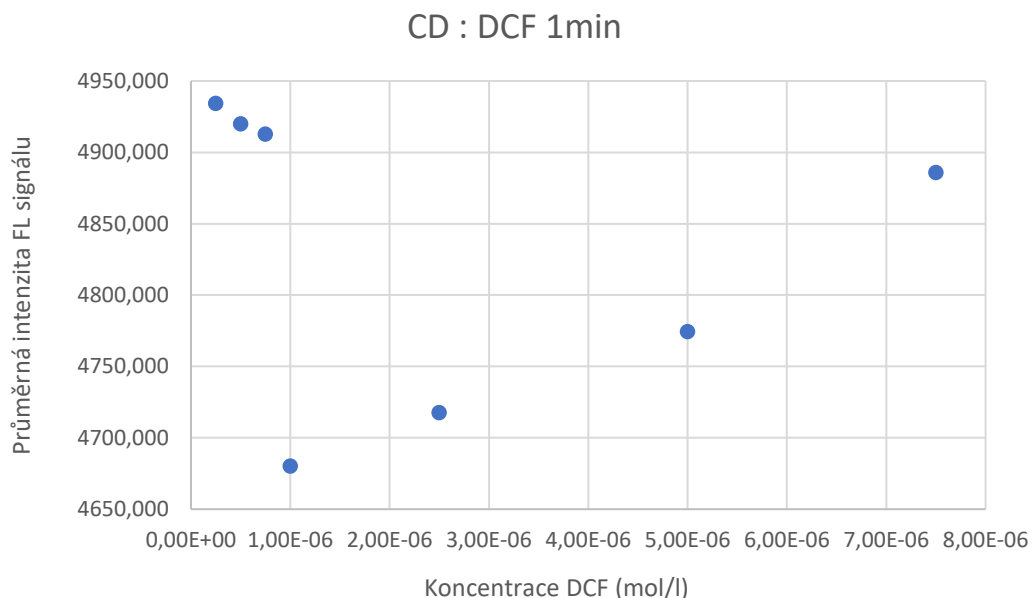
Následující měření se liší od předchozího tím, že čas zastavení v mísící cívce se změnil na 1 min. Dále byly pro měření využity roztoky, které byly uskladněny na 24 hod za laboratorní teploty a nově připravené roztoky. Koncentrace DCF  $1 \times 10^{-5}$  mol/l byla z měření vynechána jako příliš vysoká. Tyto rozdíly při uskladnění/přípravě nových roztoků se promítly do výsledků měření.

Tabulka 19 zobrazuje výsledky měření (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : DCF 1:1. Nově připravené roztoky DCF nejsou v tabulce uvedeny (jedná se o koncentrace  $2,5 \times 10^{-7}$ ,  $5 \times 10^{-7}$ ,  $7,5 \times 10^{-7}$ ).

Tabulka 19: Přehled měření (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD ( $1 \times 10^{-2}$  mol/l) : DCF 1:1

Koncentrace CD ( $1 \times 10^{-2}$ mol/l), 1 min				
Koncentrace DCF (mol/l)	Intenzita FL signálu	Průměr FL signálu	SD	RSD (%)
$1 \times 10^{-6}$	4712,2	4680,0	52,6	1,12
	4708,5			
	4619,3			
$2,5 \times 10^{-6}$	4688,0	4717,5	25,6	0,54
	4733,3			
	4731,4			
$5 \times 10^{-6}$	4769,5	4774,4	27,1	0,57
	4750,0			
	4803,6			
	4889,0	4885,7	9,3	0,19

7,5x10 <sup>-6</sup>	4875,2			
	4892,8			



Obrázek 45: Kalibrační křivka (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : DCF ve vodném prostředí a časem zastavení 1 min

Z grafu (Obrázek 45) je patrné, že koncentrace DCF, které byly připraveny 24 hod před měřením vykazují obrácenou linearitu (čím nižší koncentrace DCF, tím nižší intenzita FL signálu) než nově připravené roztoky, které vykazovaly se snižující se koncentrací vyšší intenzitu FL signálu. U tohoto měření už je patrná lineární závislost.

Tato měření ukázala, že roztoky DCF musí být připraveny minimálně 24 hod před jejich měřením a že 1 min zastavení testovaných roztoků v mísicí cívce je dostačující.

#### 5.5.1.1. Změna koncentrace CD

Toto měření popisuje Tabulka 15 a je zaměřené na změnu koncentrace (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD.

V závislosti na předchozí měření jsou vybrány koncentrace DCF, které nebyly připraveny v den měření.

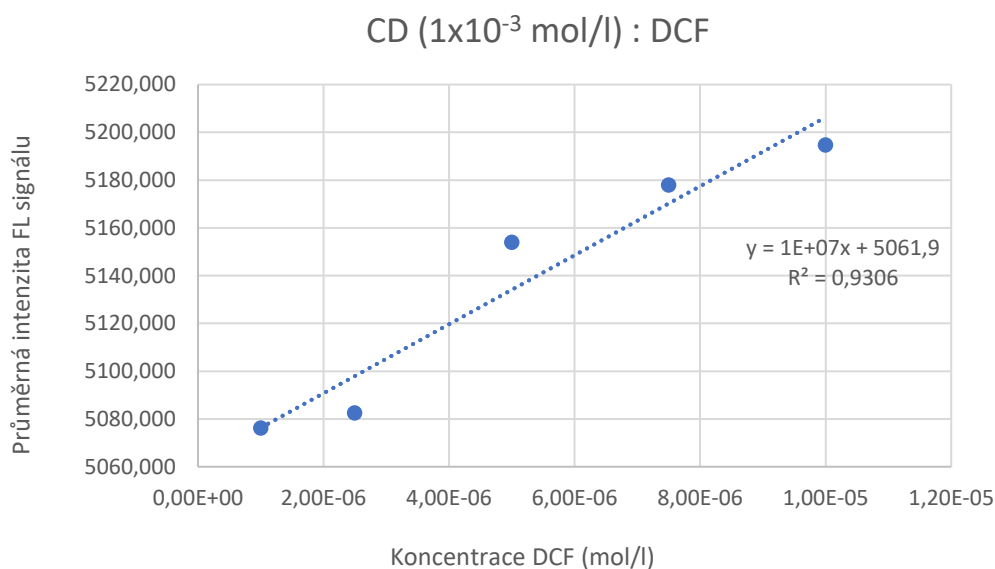
Toto měření bylo provedeno za cílem zjistit, jestli komplex poskytne stejnou nebo vyšší FL intenzitu i při snížení koncentrace CD.

Tabulka 20 zobrazuje výsledky měření (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD ( $1 \times 10^{-3}$  mol/l) : DCF 1:1.

Tabulka 20: Přehled měření (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD ( $1 \times 10^{-3}$  mol/l) : DCF 1:1

<b>Koncentrace CD (<math>1 \times 10^{-3}</math> mol/l), 1 min</b>
--

Koncentrace DCF (mol/l)	Intenzita FL signálu	Průměr FL signálu	SD	RSD (%)
1x10 <sup>-6</sup>	4986,4	5076,2	77,9	1,53
	5116,4			
	5125,8			
2,5x10 <sup>-6</sup>	5080,7	5082,4	3,8	0,08
	5079,7			
	5086,8			
5x10 <sup>-6</sup>	5080,7	5153,8	3,8	0,08
	5079,7			
	5086,8			
7,5x10 <sup>-6</sup>	5171,4	5177,9	8,9	0,17
	5174,2			
	5188,1			
1x10 <sup>-5</sup>	5156,3	5194,6	45,0	0,87
	5244,1			
	5183,4			



Obrázek 46: Kalibrační křivka (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD (1x10<sup>-3</sup> mol/l) : DCF ve vodném prostředí a časem zastavení 1 min

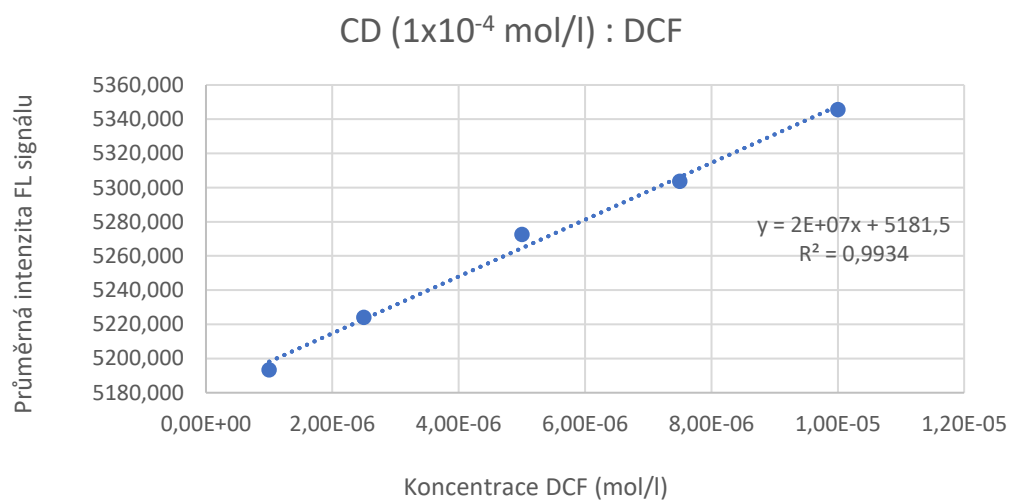
Toto měření (Obrázek 46) poskytuje lepší výsledky z pohledu linearity. Po proložení lineární spojnicí byl získán graf s hodnotou determinačního koeficientu  $R^2 = 0,9306$ , který sice není dostatečný, ale naznačuje linearitu v daném koncentračním rozmezí.



Tabulka 21 zobrazuje výsledky měření (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD ( $1 \times 10^{-4}$  mol/l) : DCF 1:1.

Tabulka 21: Přehled měření (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD ( $1 \times 10^{-4}$  mol/l) : DCF 1:1

Koncentrace CD ( $1 \times 10^{-4}$ mol/l), 1 min				
Koncentrace DCF (mol/l)	Intenzita FL signálu	Průměr FL signálu	SD	RSD (%)
$1 \times 10^{-6}$	5149,1	5193,5	40,5	0,78
	5228,4			
	5202,9			
$2,5 \times 10^{-6}$	5224,9	5224,1	5,8	0,11
	5229,4			
	5217,9			
$5 \times 10^{-6}$	5276,1	5272,6	7,4	0,14
	5264,1			
	5277,7			
$7,5 \times 10^{-6}$	5309,1	5303,6	9,1	0,17
	5293,2			
	5308,7			
$1 \times 10^{-5}$	5332,5	5345,7	15,0	0,28
	5362,1			
	5342,6			



Obrázek 47: Kalibrační křivka (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD ( $1 \times 10^{-4}$  mol/l) : DCF ve vodném prostředí a časem zastavení 1 min

Měření s  $1 \times 10^{-4}$  mol/l DCF (Obrázek 47) vykazuje hodnotu determinačního koeficientu  $R^2 = 0,9934$ , čímž je doložena linearita kalibrace.

Tato měření ukázala, že snížení koncentrace CD nemá negativní vliv na výsledky měření, naopak bylo dosaženo lepších hodnot z pohledu linearity.

### 5.5.1.2. Měření roztoků uskladněných 1-2 dny za laboratorní teploty

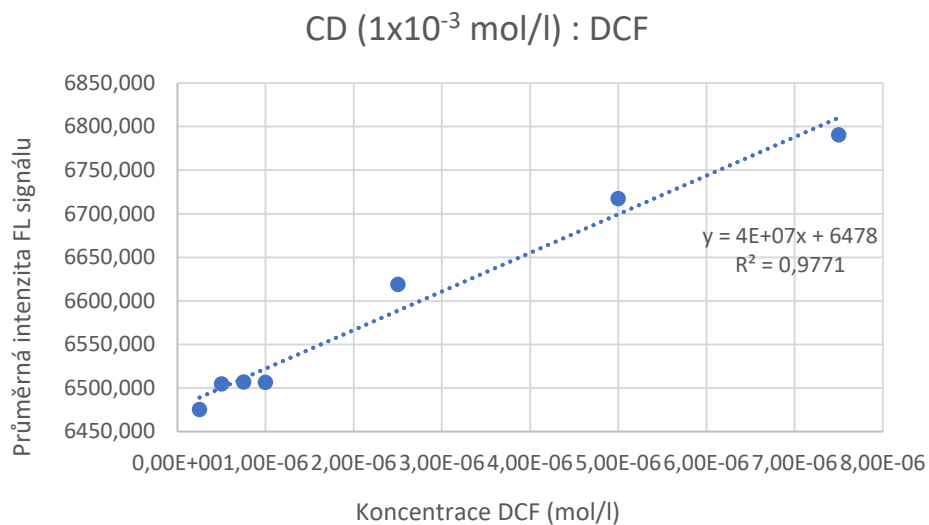
Podmínky tohoto měření popisuje Tabulka 16.

Popsaným způsobem byly proměřeny koncentrace CD  $1 \times 10^{-2}$  a  $1 \times 10^{-3}$  mol/l (Tabulka 22) a  $1 \times 10^{-4}$  mol/l (Tabulka 23). V prvním případě nebyla dosažena linearita kalibrace, proto nejsou výsledky uvedené.

Tabulka 22: Přehled měření (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD ( $1 \times 10^{-3}$  mol/l) : DCF 1:1

Koncentrace CD ( $1 \times 10^{-3}$ mol/l), 1 min				
Koncentrace DCF (mol/l)	Intenzita FL signálu	Průměr FL signálu	SD	RSD (%)
$2,5 \times 10^{-7}$	6212,1	6475,9	251,6	3,89
	6713,4			
	6500,8			
$5 \times 10^{-7}$	6565,6	6504,9	69,9	1,07
	6520,5			
	6428,5			
$7,5 \times 10^{-7}$	6445,1	6506,9	95,4	1,47
	6616,8			
	6458,7			
$1 \times 10^{-6}$	6479,0	6506,6	24,2	0,37
	6524,0			
	6516,7			
$2,5 \times 10^{-6}$	6542,0	6619,0	67,0	1,01
	6664,3			
	6650,5			
$5 \times 10^{-6}$	6699,7	6717,6	19,0	0,28
	6715,6			
	6737,5			
$7,5 \times 10^{-6}$	6733,4	6790,6	50,4	0,74
	6809,9			

	6828,4			
--	--------	--	--	--



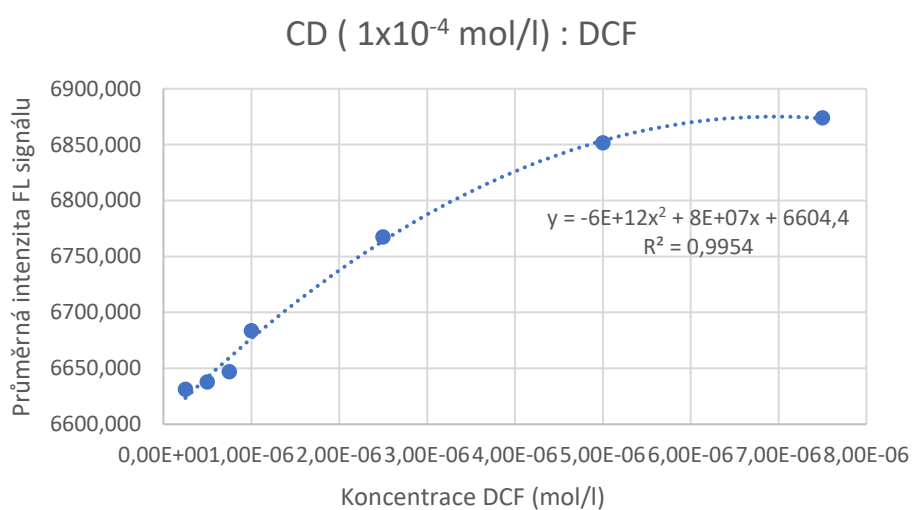
Obrázek 48: Kalibrační křivka (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD ( $1 \times 10^{-3}$  mol/l) : DCF ve vodném prostředí a časem zastavení 1 min

Obrázek 48 popisuje výsledná graf proměření koncentrace CD  $1 \times 10^{-3}$  mol/l. Hodnota determinačního koeficientu pro toto měření je  $R^2 = 0,9771$ .

Tabulka 23: Přehled měření (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD ( $1 \times 10^{-4}$  mol/l) : DCF 1:1

Koncentrace CD ( $1 \times 10^{-4}$ mol/l), 1 min				
Koncentrace DCF (mol/l)	Intenzita FL signálu	Průměr FL signálu	SD	RSD (%)
$2,5 \times 10^{-7}$	6612,0	6631,2	16,6	0,25
	6639,0			
	6642,2			
$5 \times 10^{-7}$	6625,0	6637,8	13,4	0,20
	6636,5			
	6651,8			
$7,5 \times 10^{-7}$	6663,1	6647,0	15,8	0,24
	6631,6			
	6646,3			
$1 \times 10^{-6}$	6622,3	6656,8	57,9	0,87
	6722,1			
	6723,1			
$2,5 \times 10^{-6}$	6705,8	6721,3	22,8	0,34
	6710,7			

	6747,5			
$5 \times 10^{-6}$	6804,1	6802,0	2,0	0,03
	6800,2			
	6801,7			
$7,5 \times 10^{-6}$	6869,3	6873,9	9,0	0,13
	6884,3			
	6868,2			



Obrázek 49: Kalibrační křivka (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD ( $1 \times 10^{-4}$  mol/l) : DCF ve vodním prostředí a časem zastavení 1 min

Z grafu (Obrázek 49) je patrné že hodnota spolehlivosti je  $R^2 = 0,9954$ .

Tato měření prokázala, že pro měření kalibrační závislosti s kultivačním médiem bude vhodné použít koncentrace CD  $1 \times 10^{-3}$  mol/l a  $1 \times 10^{-4}$  mol/l, u kterých byly získány hodnoty determinačního koeficientu  $R^2 = 0,9771$  a  $R^2 = 0,9954$ .

## 5.5.2 Měření kalibrační závislosti s kultivačním médiem

Podmínky měření popisuje Tabulka 17.

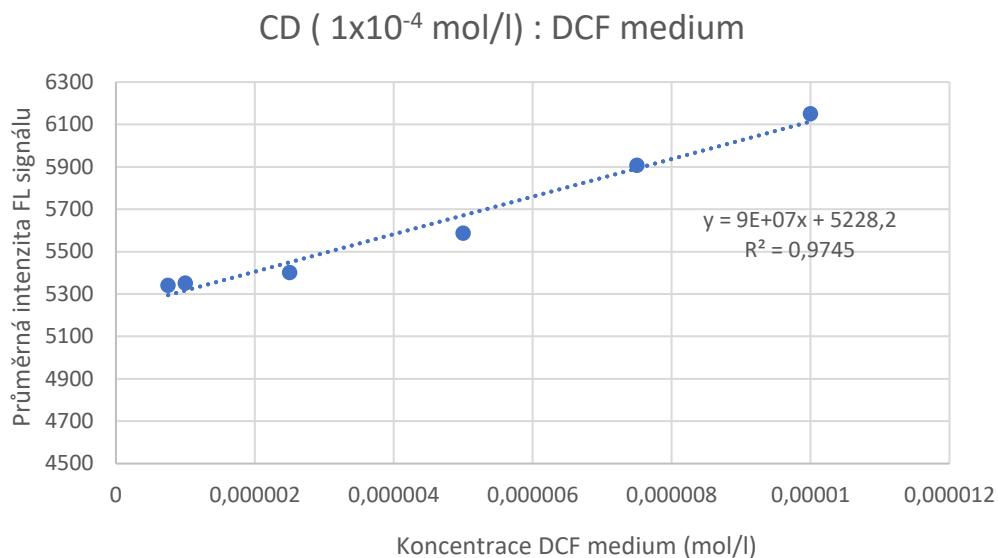
Při tomto měření bylo využito kultivační medium Gibco Opti-MEM reduce serum.

Testování koncentrace CD ( $1 \times 10^{-3}$  mol/l) neprokázalo linearitu ve sledovaném kalibračním rozsahu, proto byla dále snížena koncentrace CD.

Testování koncentrace CD ( $1 \times 10^{-4}$  mol/l) (Tabulka 24).

Tabulka 24: Přehled měření (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD ( $1 \times 10^{-4}$  mol/l) : DCF medium 1:1

Koncentrace CD ( $1 \times 10^{-4}$ mol/l)				
Koncentrace DCF medium (mol/l)	Intenzita FL signálu	Průměr FL signálu	SD	RSD (%)
$2,5 \times 10^{-7}$	4960,4	4947,3	51,7	1,05
	4890,3			
	4991,2			
$5 \times 10^{-7}$	5048,3	5097,8	71,1	1,40
	5065,7			
	5179,3			
$7,5 \times 10^{-7}$	5329,8	5340,6	20,9	0,39
	5364,7			
	5327,4			
$1 \times 10^{-6}$	5420,9	5352,0	60,1	1,12
	5325,3			
	5309,9			
$2,5 \times 10^{-6}$	5397,7	5401,9	7,8	0,14
	5410,9			
	5397,0			
$5 \times 10^{-6}$	5502,4	5586,5	73,7	1,32
	5639,5			
	5617,6			
$7,5 \times 10^{-6}$	5756,2	5907,3	130,9	2,22
	5985,4			
	5980,5			
$1 \times 10^{-5}$	6125,7	6150,0	51,3	0,83
	6115,4			
	6209,0			



Obrázek 50: Kalibrační křivka (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD ( $1 \times 10^{-4}$  mol/l) : DCF medium

Na grafu (Obrázek 50) hodnota determinačního koeficientu  $R^2 = 0,9745$ , která nevychází lépe než determinační koeficient ve srovnání s proměřením stejné koncentrace CD s DCF ve vodném prostředí.

Toto měření ukázalo (Obrázek 50), že pro tvorbu komplexu CD : DCF medium je vhodnější zvolit nižší koncentraci CD a to ( $1 \times 10^{-4}$  mol/l), u které bylo dosaženo lepších výsledků linearity, které ukazuje hodnota determinačního koeficientu  $R^2$ .

## 6. Diskuse

V úvodu bylo potřeba experimentálně zjistit vhodné podmínky pro nastavení spektrofluorimetru. Po prostudování rešerše a následném testování podmínek nastavení spektrofluorimetru byla zvolena EX 290 nm a EM 380 nm. Všechny testované roztoky (vyjma těch s kultivačním médiem) byly ředěny superčistou vodou.

Následně bylo třeba proměřit a vybrat vhodný CD, který poskytne s DCF komplex, u kterého bude testovaná intenzita FL signálu.

Při testování byly proměřeny komplexy CD : DCF a CD : H<sub>2</sub>O v poměrech 1:1 u 13 CD. Pozorován byl nárůst, ale i pokles intenzity FL signálu a jednotlivé CD byly rozděleny do 4 skupin podle výsledného chování. Z tohoto měření poskytl karboxymethyl- $\alpha$ -CD nejlepší výsledky (nárůst intenzity FL signálu komplexu vůči slepému pokusu). Dále  $\beta$ -CD sodná sůl,  $\alpha$ -CD sulfatovaná sodná sůl a karboxymethyl- $\gamma$ -CD byly brány v úvahu pro další testování (komplex poskytl mírně vyšší intenzitu FL signálu než slepý pokus).

Při testování stability komplexů v intervalu 5 minut byl zaznamenán nárůst intenzity FL signálů u CD ( $\alpha$ -CD sulfatovaná sodná sůl a karboxymethyl- $\alpha$ -CD), pokles intenzity FL signálů nastal u těchto CD ( $\beta$ -CD sodná,  $\alpha$ -CD hydrát,  $\beta$ -CD hydrát a  $\gamma$ -CD). Toto testování rozdělilo stabilitu komplexu s CD na ty, které s časem ztrácí původní schopnost fluorescence a na CD, u kterých se časem tato schopnost zesílila.

Další testování probíhalo za využití SIA systému propojeného se spektrofluorimetrem.

Jako modelový CD, na kterém bylo testováno nastavení SIA systému byl vybrán  $\alpha$ -CD hydrát. V závislosti na měření byl nastavený „accumulation time“ na 1 s a byla vybrána průtoková rychlost 30  $\mu$ l/s. Za těchto podmínek probíhalo další měření.

Bylo naprogramováno celkem 5 ovládacích programů. Při využití ovládacího programu 1 a 2 nebylo dosaženo vhodných výsledků, a proto nebyly dále v testování  $\alpha$ -CD hydrát použity (nerozlišena tvorba komplexu s DCF od slepého pokusu, rozštěpené tvary píků).

V závislosti na výsledcích měření při předchozím testování byl zvolen karboxymethyl- $\alpha$ -CD. Jelikož se podmínky vzniku komplexu v průtokovém systému mírně liší, byl vybrán k testování i (2-hydroxypropyl)-  $\gamma$ -CD. Tyto dva CD se liší tím, že u (2-hydroxypropyl)-  $\gamma$ -CD byla zaznamenána snížená intenzita FL signálu v komplexu s DCF vůči komplexu s H<sub>2</sub>O (u karboxymethyl- $\alpha$ -CD to bylo naopak). Ani u těchto CD ovládací program 1 a 2 neposkytl

uspokojivé výsledky. Proto bylo nutné změnit a upravit ovládací programy. Program 3 byl vyřazen z testování, protože samotné promísení aspirovaných roztoků v mísící cívce nestačilo pro následnou detekci (rozdílné tvary a rozštěpení vrcholů píků). Byla zvažována nejen změna ovládacího programu, ale i změna podmínek pro testované roztoky. Testované roztoky byly smíseny a proměřeny za 24 hodin za využití ovládacího programu 2. Ukázalo se, že pro lepší výsledky (vyšší FL intenzita, lepší tvar píku) je nezbytné mezi sebou nechat roztoky reagovat a až poté změřit. A tak byly použity ovládací programy 4 a 5, které byly navrženy pro mírné prodloužení doby reakce při vzniku komplexu mezi CD a DCF v průtokovém systému. Při testování těchto dvou ovládacích programů byl pro další měření zvolen program 5, protože při jeho použití byla naměřena vyšší intenzita FL signálu u obou CD. Při porovnání intenzit FL signálů obou CD měl vyšší intenzitu (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD a proto byl použit pro proměření kalibračních závislostí.

Pro sledování kalibrační závislosti byl zvolen (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD a ovládací program 5. Nejprve byla testována kalibrační závislost ve vodném prostředí a poté v kultivačním médiu.

Při testování ve vodném prostředí se potvrdilo, že pro získání linearit není třeba před měřením nechat testované roztoky mezi sebou reagovat dlouhou dobu a doba zastavení v mísící cívce 1 min je dostačující.

Testování různých koncentrací CD ve vodném prostředí ( $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-4}$  mol/l) ukázalo, že koncentrace  $1 \times 10^{-3}$  mol/l a  $1 \times 10^{-4}$  mol/l vykazovaly vyšší linearitu a budou dále vhodné i pro testování s kultivačním médiem. Jejich výběr byl hodnocen podle determinačního koeficientu  $R^2 = 0,9771$  ( $1 \times 10^{-3}$  mol/l) a  $R^2 = 0,9954$  ( $1 \times 10^{-4}$  mol/l).

U testování s kultivačním médiem a koncentrací CD  $1 \times 10^{-3}$  mol/l nebyla prokázána linearita. Zatímco koncentrace  $1 \times 10^{-4}$  mol/l neposkytla vyšší determinační koeficient ( $R^2 = 0,9745$ ), než při proměření ve vodném prostředí. I tak jsou tyto podmínky navrženy pro využití při měření reálných vzorků z metabolických studií, ve kterých bude dále nutné snížit objem aspirovaných roztoků a nalézt konkrétní lineární rozsah kalibrace odpovídající roztokům odebraným v rámci této studie.



## 7. Závěr

V této diplomové práci byla sledována tvorba komplexů CD : DCF, a jejich využití pro citlivé fluorimetrické stanovení DCF v SIA systému.

Byly testovány podmínky (výběr CD, vhodný poměr CD : DCF pro tvorbu komplexu, EX a EM vlnová délka, skladování roztoků), za kterých bude komplex CD : DCF při nízkých koncentracích možné měřit a bude vykazovat dostatečnou FL intenzitu odlišenou od slepého pokusu. Dále proběhla optimalizace stanovení DCF v průtokovém SIA systému s využitím několika způsobů promísení aspirovaných zón a prodloužení doby reakce. Následně byly tyto podmínky uplatněny při proměření kalibračních závislostí, včetně roztoků připravených ředěním kultivačním médiem a tím potvrzena možnost stanovení DCF po jeho metabolizaci lidskými hepatocyty.

Závěrem lze konstatovat, že byla vyvinuta citlivá a rychlá metoda stanovení DCF, jehož fluorescenční vlastnosti byly významně zesíleny v přítomnosti CD. Tato metoda byla založena na tvorbě komplexu CD : DCF, kdy DCF proniká do dutiny CD. Také byla prokázána možnost stanovení tohoto komplexu v SIA systému pro plánované využití při monitorování metabolizace DCF v lidském organismu.

## 8. Seznam použité literatury

- [1] Český lékopis 2023, Grada Publishing a.s., s. 2694.
- [2] Národní centrum pro biotechnologické informace. PubChem Compound Summary pro CID 5018304, diklofenak sodný. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diclofenac-sodium> (březen 2024)
- [3] <https://www.medchemexpress.com/Diclofenac-Sodium.html> (březen 2024)
- [4] Katzung B. G. Základní a klinická farmakologie. Vyd. v ČR 2., Praha: H & H, 2006, s. 1106, ISBN 80-7319-056-7.
- [5] Lüllmann L., Mohr K., Wehling M. Farmakologie a toxikologie; GRADA 2004, s. 728, ISBN: 80-247-0836-1.
- [6] Pavelka K. a kol.: Farmakoterapie revmatických onemocnění, GRADA 2005, s. 434, ISBN: 80-247-0495-5.
- [7] Castillo M. A., Bruzzone L. Indirect Fluorometric Determination of Diclofenac Sodium. Analytical Sciences 22, (2006) 431–433. <https://doi.org/10.2116/analsci.22.431>
- [8] Arancibia J. A., Boldrini M. A., Escandar G. M. Spectrofluorimetric determination of diclofenac in the presence of  $\alpha$ -cyclodextrin. Talanta 52, (2000) 261–268.
- [9] Dani, Randa & Elbashir, Abdalla. Host-guest inclusion complex of  $\beta$ -cyclodextrin and cephalixin and its analytical application. International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences 1, (2013) 2278–8700.
- [10] Elbashir A. A., Dsugi N. F., Mohamed T. O., Aboul-Enein H. Y. Spectrofluorometric analytical applications of cyclodextrins. Luminescence, (2013), DOI 10.1002/bio.2504.
- [11] Harada, Akira, Yoshinori Takashima, and Hiroyasu Yamaguchi. Cyclodextrin-based supramolecular polymers. Chemical Society Reviews 38.4, (2009) 875-882.
- [12] Saokham P., Muankaew C., Jansook P., Loftsson T. Solubility of Cyclodextrins and Drug/Cyclodextrin Complexes. Molecules 23, (2018) 1161.
- [13] Arancibia J. A., Escandar G. M. Complexation study of diclofenac with beta-cyclodextrin and spectrofluorimetric determination. Analyst, (1999) 1833-1838.

- [14] Mehta S. K., Bhasin K. K., Dham S. Energetically favorable interactions between diclofenac sodium and cyclodextrin molecules in aqueous media. *Journal of Colloid and Interface Science* 326(2), (2008) 374-81.
- [15] Manzoori J. L., Amjadi M. Spectrofluorimetric study of host-guest complexation of ibuprofen with beta-cyclodextrin and its analytical application. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 59, (2003) 909-916.
- [16] Sevgi Tatar Ulu. New and Sensitive Spectrofluorimetric Method for the Determination of Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs, Etodolac and Diclofenac Sodium in Pharmaceutical Preparations through Derivatization with 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. *Journal of Food and Drug Analysis* 19, (2011) 94-101.
- [17] Navrátil, Leoš a Jozef Rosina, et al. *Medicínská biofyzika*. 2. vydání. Praha: Grada, 2005, s. 184-185, ISBN: 978-80-271-0209-9.
- [18] <https://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/mikro/mscope/fluor/fluor.htm> (březen 2024)
- [19] Sklenářová H. Luminiscenční metody přednáška k předmětu Speciální metody instrumentální analýzy. Univerzita Karlova Farmaceutická fakulta v Hradci Králové <https://intranet.faf.cuni.cz/getmedia/8660474e-b7c7-4ab5-98d6-e075cc375c4e/Luminiscencni-metody.aspx?disposition=attachment> (březen 2024)
- [20] Stokes G. G. On the change of refrangibility of light. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 142, (1852) 463-562.
- [21] Principy fluorescenční spektroskopie, dostupné z <https://www1.lf1.cuni.cz/~zfsar/fluorescence/soubory/principy.htm#:~:text=Stokes%C5%99> (březen 2024)
- [22] Lakowicz J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3. vyd., Berlin/Heidelberg: Springer, (2006) 27-51, ISBN 978-0387312781.
- [23] <https://dokumenty.upce.cz/FCHT/kbbv-vk/instrumentalni-met-anal/zaklady-luminiscencni-spektrometrie.pdf> (březen 2024)
- [24] D. C. Harris. *Quantitative chemical analysis*, 4. vyd., Freeman, New York (USA), (2003) 410.
- [25] <https://webservices3.lf1.cuni.cz/printbook-render/data/DRfwvY6WqmjKukUz0AxNga89ObeIChoJy1cVBiQ4/Article.pdf> (březen 2024)

- [26] Zagatto E. A. G., Vida A. C. F., Worsfold P. J. Flow Analysis: Overview☆. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering [online]. Elsevier, 2016, 2016. ISBN 9780124095472. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.12202-4
- [27] Sklenářová H. Automatizace-terminologie, průtokové techniky prezentace k předmětu Speciální metody instrumentální analýzy. Univerzita Karlova Farmaceutická fakulta v Hradci Králové <https://intranet.faf.cuni.cz/getmedia/49108e4b-4d77-4648-bc87-d045606b510d/Automatizace-v-analyticke-chemii.aspx?disposition=attachment> (březen 2024)
- [28] Sklenářová H. Neseparační průtokové metody česky přednáška k předmětu Speciální metody instrumentální analýzy. Univerzita Karlova Farmaceutická fakulta v Hradci Králové <https://intranet.faf.cuni.cz/getmedia/d7bb8a6b-13e1-4ee1-a2bc-857afc9d9784/Neseparacni-prutokove-metody-cesky.aspx?disposition=attachment> (březen 2024)
- [29] Klimundová J. Aplikace sekvenční injekční analýzy ve farmaceutické analýze. Hradec Králové, 2006. Disertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie. Vedoucí práce Solich, P.
- [30] Ruzicka J., Marshall G. Flow Injection Tutorial, <https://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%202.1.2.%20Flow%20Programming.html> (březen 2024)
- [31] Pasekova H., Polasek M., Solich P. Sequential injection analysis. Chemické listy, (1999) 354 - 359.
- [32] Šatínský D., et al. Sequential injection chromatographic determination of paracetamol, caffeine, and acetylsalicylic acid in pharmaceutical tablets. Journal of Separation Science 27(7-8), (2004) 529-536.
- [33] Durán A., et al. Virtual instrument for an automated potentiometric e-tongue employing the SIA technique. Sensors 6, (2005) 19-29.
- [34] Carlos M. C. Infante, Jorge C. Masini, Allan C. V. dos Santos, Development of a spectrophotometric Sequential Injection Analysis (SIA) procedure for determination of ammonium: A Response Surface Methodology (RSM) approach. Microchemical Journal volume 98, (2011) 97-102.

- [35] Víctor Cerdà, Laura Ferrer, Jessica Avivar, Amalia Cerdà, Chapter 1 - Evolution and Description of the Principal Flow Techniques, Flow Analysis, Elsevier, (2014) 1-42. Dostupného z <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/sequential-injection-analysis>
- [36] Lenehan C. E., Barnett N. W., Lewis S. W. Sequential injection analysis. Analyst 127(8), (2002) 997-1020.
- [37] Neil W. Barnett, Claire E. Lenehan, Simon W. Lewis, Sequential injection analysis: an alternative approach to process analytical chemistry. Trends in Analytical Chemistry 18, (1999) 346-353.
- [38] <https://img54.chem17.com/5/20121024/634866924877656250.pdf> (březen 2024)

## 9. Přílohy

### 9.1. Příloha č. 1: Ovládací program 1

Loop Start (#) 3

**'pump fill carrier**

Syringe Pump Valve in

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 70

Syringe Pump Aspirate (microliter) 1000

Syringe Pump Delay Until Done

**'CD aspirace**

Syringe Pump Valve out

Multiposition Valve port 2

Syringe Pump Delay Until Done

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30

Syringe Pump Aspirate (microliter) 30

Syringe Pump Delay Until Done

**'DCF aspirace**

Syringe Pump Valve Out

Multiposition Valve port 3

Syringe Pump Delay Until Done

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30

Syringe Pump Aspirate (microliter) 30

Syringe Pump Delay Until Done

**'detekce**

Multiposition Valve port 5

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30

Syringe Pump Empty

Syringe Pump Delay Until Done

Loop End

### 9.2. Příloha č. 2: Ovládací program 2

Loop Start (#) 3

**'pump fill carrier**

Syringe Pump Valve in

Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 70

Syringe Pump Aspirate (microliter) 1000

Syringe Pump Delay Until Done

#### 'aspirace směsi

Syringe Pump Valve Out  
Multiposition Valve port 2  
Syringe Pump Delay Until Done  
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30  
Syringe Pump Aspirate (microliter) 30  
Syringe Pump Delay Until Done

#### 'detekce

Multiposition Valve port 5  
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30  
Syringe Pump Empty  
Syringe Pump Delay Until Done

Loop End

### 9.3. Příloha č. 3: Ovládací program 3

Loop Start (#) 3

#### 'pump fill carrier

Syringe Pump Valve in  
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 70  
Syringe Pump Aspirate (microliter) 1000  
Syringe Pump Delay Until Done

#### 'CD aspirace

Syringe Pump Valve out  
Multiposition Valve port 2  
Syringe Pump Delay Until Done  
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30  
Syringe Pump Aspirate (microliter) 30  
Syringe Pump Delay Until Done

#### 'DCF aspirace

Syringe Pump Valve Out  
Multiposition Valve port 3  
Syringe Pump Delay Until Done  
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30  
Syringe Pump Aspirate (microliter) 30  
Syringe Pump Delay Until Done

#### 'aspirace vody

Syringe Pump Valve Out  
Multiposition Valve port 4

Syringe Pump Delay Until Done  
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30  
Syringe Pump Aspirate (microliter) 30  
Syringe Pump Delay Until Done

#### 'promísení

Syringe Pump Valve Out  
Multiposition Valve port 4  
Syringe Pump Delay Until Done  
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30  
Syringe Pump Aspirate (microliter) 30  
Syringe Pump Delay Until Done

Syringe Pump Valve Out  
Multiposition Valve port 4  
Syringe Pump Delay Until Done  
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30  
Syringe Pump Aspirate (microliter) 30  
Syringe Pump Delay Until Done

#### 'detekce

Multiposition Valve port 5  
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30  
Syringe Pump Empty  
Syringe Pump Delay Until Done

Loop End

## 9.4. Příloha č. 4: Ovládací program 4

Loop Start (#) 3

#### 'pump fill carrier

Syringe Pump Valve in  
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 70  
Syringe Pump Aspirate (microliter) 1000  
Syringe Pump Delay Until Done

#### 'CD aspirace

Syringe Pump Valve out  
Multiposition Valve port 2  
Syringe Pump Delay Until Done  
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30  
Syringe Pump Aspirate (microliter) 30



Syringe Pump Delay Until Done

**'DCF aspirace**

Syringe Pump Valve Out  
Multiposition Valve port 3  
Syringe Pump Delay Until Done  
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30  
Syringe Pump Aspirate (microliter) 30  
Syringe Pump Delay Until Done

**'zastavení**

**Delay (sec) 60**

**'detekce**

Multiposition Valve port 5  
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30  
Syringe Pump Empty  
Syringe Pump Delay Until Done

Loop End

## 9.5. Příloha č. 5: Ovládací program 5

Loop Start (#) 3

**'pump fill carrier**

Syringe Pump Valve in  
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 70  
Syringe Pump Aspirate (microliter) 1000  
Syringe Pump Delay Until Done

**'CD aspirace**

Syringe Pump Valve out  
Multiposition Valve port 2  
Syringe Pump Delay Until Done  
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30  
Syringe Pump Aspirate (microliter) 30  
Syringe Pump Delay Until Done

**'DCF aspirace**

Syringe Pump Valve Out  
Multiposition Valve port 3  
Syringe Pump Delay Until Done  
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30

Syringe Pump Aspirate (microliter) 30  
Syringe Pump Delay Until Done

**'aspirace vody**

Syringe Pump Valve Out  
Multiposition Valve port 4  
Syringe Pump Delay Until Done  
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30  
Syringe Pump Aspirate (microliter) 30  
Syringe Pump Delay Until Done

**'promísení**

Syringe Pump Valve Out  
Multiposition Valve port 4  
Syringe Pump Delay Until Done  
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30  
Syringe Pump Aspirate (microliter) 30  
Syringe Pump Delay Until Done

Syringe Pump Valve Out  
Multiposition Valve port 4  
Syringe Pump Delay Until Done  
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30  
Syringe Pump Aspirate (microliter) 30  
Syringe Pump Delay Until Done

**'zastavení**

**Delay (sec) 60**

**'detekce**

Multiposition Valve port 5  
Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 30  
Syringe Pump Empty  
Syringe Pump Delay Until Done

Loop End

## 10. Seznam obrázků

Obrázek 1: Vzorec sodné soli diklofenaku [3].....	13
Obrázek 2: Struktura $\alpha$ -CD [11].....	14
Obrázek 3: Absorpční a emisní spektrum fluorescein 5-isokyanátu [18].....	19
Obrázek 4: Popis a součásti spektrofluorimetru [19][23].....	20
Obrázek 5: Spektrofluorimetr RF 6000.....	21
Obrázek 6: Zobrazení principu SIA metody [28][30].....	24
Obrázek 7: Schéma SIA systému [28].....	25
Obrázek 8: Hlavní panel programu FIALab for Windows 5.0.....	26
Obrázek 9: Panel pro propojení ovládacího programu s SIA systémem.....	27
Obrázek 10: Tvorba a spuštění programu pro měření SIA.....	27
Obrázek 11: Schéma použitého SIA systému.....	33
Obrázek 12: Excitační spektrum $\alpha$ -CD-hydrátu.....	40
Obrázek 13: Excitační spektra pro $\alpha$ -CD-hydrát, komplex $\alpha$ -CD-hydrát : DCF (1:1,1:2 a 2:1), komplex sulfatované sodné soli $\beta$ -CD (1:1,1:2 a 2:1) a samotné sulfatované sodné soli $\beta$ -CD.....	41
Obrázek 14: Emisní spektra pro zjištění optimálních podmínek měření.....	41
Obrázek 15: Emisní spektra $\alpha$ -CD-hydrátu v různých poměrech s DCF, popřípadě s H <sub>2</sub> O.....	42
Obrázek 16: Emisní spektra $\beta$ -CD sodná sůl proměřenou s DCF v různých poměrech a v poměru s vodou 1:1.....	42
Obrázek 17: Emisní spektrum $\alpha$ -CD-hydrátu, $\beta$ -CD sodné soli a sodné soli DCF.....	43
Obrázek 18: Emisní spektra komplexů CD : DCF 1:1 a CD : H <sub>2</sub> O 1:1. U všech spekter poskytuje maximum komplex CD : H <sub>2</sub> O.....	44
Obrázek 19: Emisní spektra zobrazující komplex karboxymethyl- $\alpha$ -CD: DCF v poměru 1:1 (maximum) a karboxymethyl- $\alpha$ -CD: H <sub>2</sub> O v poměru 1:1.....	45
Obrázek 20: Emisní spektra komplexů CD : DCF 1:1 a CD : H <sub>2</sub> O 1:1.....	45
Obrázek 21: Emisní spektra komplexů CD : DCF 1:1 a CD : H <sub>2</sub> O 1:1.....	46
Obrázek 22: Stabilita emisního spektra $\beta$ -CD sodná sůl : sodné soli DCF v poměru 1:1 v intervalu 5 minut.....	47
Obrázek 23: Stabilita emisního spektra $\beta$ -CD sodná sůl : sodné soli DCF v poměru 1:1 po 2 hod od smísení.....	47
Obrázek 24: Stabilita emisních spekter komplexů proměřených v intervalu 5 min a zjištění poklesu intenzity.....	48
Obrázek 25: Stabilita emisních spekter komplexů proměřených v intervalu 5 min a zjištění nárůstu intenzity.....	48
Obrázek 26: Stabilita emisních spekter komplexů proměřených v intervalu 5 min.....	49
Obrázek 27: Záznam měření komplexu $\alpha$ -CD-hydrát : DCF 1:2 při „accumulation time“ 1 s v SIA systému a jeho zvětšený tvar píku.....	49
Obrázek 28: Zvětšení píků komplexu $\alpha$ -CD-hydrát : DCF 1:2 při různém „accumulation time“.....	50
Obrázek 29: Záznam měření komplexu $\alpha$ -CD-hydrát : DCF 1:2 při průtokové rychlosti 30 $\mu$ l/s.....	50
Obrázek 30: Přehled zvětšených píků pro jednotlivé průtokové rychlosti u komplexu $\alpha$ -CD-hydrát : DCF 1:2.....	51
Obrázek 31: Záznam měření $\alpha$ -CD-hydrát : H <sub>2</sub> O 1:1, ovládací program 4, čas zastavení v mísící cívce 10 s a průtoková rychlost 30 $\mu$ l/s.....	52
Obrázek 32: Záznam měření $\alpha$ -CD-hydrát : DCF 1:2, ovládací program 4, čas zastavení v mísící cívce 10 s a průtoková rychlost 30 $\mu$ l/s.....	52

Obrázek 33: Záznam jednotlivých měření $\alpha$ -CD-hydrátu : DCF 1:2 při různém čase zastavení v mísící cívce 10/15/20/25/30 s (na obrázku jsou časy řazeny vzestupně zleva doprava) .....	53
Obrázek 34: Souhrn záznamů měření: .....	54
Obrázek 35: Záznam měření komplexu karboxymethyl- $\alpha$ -CD : H <sub>2</sub> O 1:1 při čase zastavení 10/20/30/40/50/60 s, ovládací program 4.....	54
Obrázek 36: Záznam měření komplexu karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF 1:1 při čase zastavení 10/20/30/40/50/60 s, ovládací program 4.....	55
Obrázek 37: Záznam měření komplexu (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : H <sub>2</sub> O 1:1 s průtokovou rychlostí 30/40/50 $\mu$ l/s, ovládací program 1.....	56
Obrázek 38: Záznam měření komplexu (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : DCF 1:1 s průtokovou rychlostí 30/40/50 $\mu$ l/s, ovládací program 1.....	56
Obrázek 39: Záznam měření komplexu (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : H <sub>2</sub> O 1:1 s průtokovou rychlostí 30/40/50 $\mu$ l/s, ovládací program 2.....	57
Obrázek 40: Záznam měření komplexu (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : DCF 1:1 s průtokovou rychlostí 30/40/50 $\mu$ l/s, ovládací program 2.....	57
Obrázek 41: Záznam měření (vlevo) karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF 1:1 měřeného v čas přípravy (růžová barva) a karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF 1:1 měřeného po 24 hod (černá barva). Záznam měření (vpravo) (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : DCF 1:1 měřeného v čas přípravy (černá barva) a (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : DCF 1:1 měřeného po 24 hod (modrá barva).....	58
Obrázek 42: Souhrn záznamů měření komplexu karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF 1:1 za využití ovládacího programu 4 nebo 5 s průměrnou intenzitou FL signálu .....	59
Obrázek 43: Souhrn grafů spekter komplexu (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : DCF 1:1 za využití ovládacího programu 4 nebo 5 SIA systému s průměrnou intenzitou FL signálu .....	60
Obrázek 44: Kalibrační křivka (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : DCF ve vodném prostředí a časem zastavení 10 min.....	62
Obrázek 45: Kalibrační křivka (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : DCF ve vodném prostředí a časem zastavení 1 min.....	63
Obrázek 46: Kalibrační křivka (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD ( $1 \times 10^{-3}$ mol/l) : DCF ve vodném prostředí a časem zastavení 1 min .....	64
Obrázek 47: Kalibrační křivka (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD ( $1 \times 10^{-4}$ mol/l) : DCF ve vodném prostředí a časem zastavení 1 min .....	65
Obrázek 48: Kalibrační křivka (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD ( $1 \times 10^{-3}$ mol/l) : DCF ve vodném prostředí a časem zastavení 1 min .....	67
Obrázek 49: Kalibrační křivka (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD ( $1 \times 10^{-4}$ mol/l) : DCF ve vodném prostředí a časem zastavení 1 min .....	68
Obrázek 50: Kalibrační křivka (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD ( $1 \times 10^{-4}$ mol/l) : DCF medium.....	70

## 11. Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled vlastností jednotlivých typů cyklodextrinů [10].....	14
Tabulka 2: Výsledky rešerše prací zabývajících se fluorimetrickým stanovením DCF za využití CD nebo derivatizace.....	16
Tabulka 3: Přehled použitých CD, jejich molární hmotnosti a navážky, které byly ředěny superčistou vodou.....	29
Tabulka 4: Souhrn nastavení spektrofluorimetru pro předběžná měření EX a EM spekter .....	31
Tabulka 5: Souhrn finálního nastavení spektrofluorimetru pro EX a EM spektra.....	31
Tabulka 6: Přehled komplexů CD: DCF.....	32
Tabulka 7: Nastavení spektrofluorimetru při využití programu „Time course“ .....	34
Tabulka 8: Přehled testování $\alpha$ -CD hydrátu nebo komplexu $\alpha$ -CD hydrátu : DCF (H <sub>2</sub> O) s využitím ovládacího programu 4 nebo kombinací programů 2 a 4 při testování různého času zastavení v mísící cívce.....	35
Tabulka 9: Přehled testování komplexů karboxymethyl- $\alpha$ -CD: sodné soli DCF (H <sub>2</sub> O) za využití ovládacích programů 1, 2 nebo 4, při měření různých průtokových rychlostí nebo různého času zastavení v mísící cívce. ....	35
Tabulka 10: Přehled testování komplexů (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD : sodné soli DCF (H <sub>2</sub> O) za využití ovládacích programů 1 nebo 2, při měření různých průtokových rychlostí. ....	36
Tabulka 11: Přehled podmínek testování vybraných CD po 24 hod uskladnění za laboratorní teploty	36
Tabulka 12: Přehled podmínek testování karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF (1:1) a (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD: DCF (1:1) při různých časech zastavení v mísící cívce a využití ovládacího programu 4.....	36
Tabulka 13: Přehled podmínek testování karboxymethyl- $\alpha$ -CD : DCF (1:1) a (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD: DCF (1:1) času zastavení v mísící cívce 10 min a využití ovládacího programu 5. ....	37
Tabulka 14: Přehled testování komplexu CD : DCF při testování různých koncentrací DCF, s využitím ovládacího programu 5 a různým časem zastavení v mísící cívce .....	37
Tabulka 15: Přehled testování komplexu CD : DCF při změně koncentrací CD, s využitím ovládacího programu 5 a časem zastavení v mísící cívce 1 min.....	38
Tabulka 16: Souhrn podmínek měření pro proměření roztoků, které byly uskladněny 1-2 dny za laboratorní teploty a následně proměřeny pomocí ovládacího programu 5 .....	38
Tabulka 17: Souhrn podmínek měření za využití kultivačního média Gibco Opti-MEM .....	39
Tabulka 18: Přehled měření (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD (1x10 <sup>-2</sup> mol/l) : DCF 1:1 .....	61
Tabulka 19: Přehled měření (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD (1x10 <sup>-2</sup> mol/l) : DCF 1:1 .....	62
Tabulka 20: Přehled měření (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD (1x10 <sup>-3</sup> mol/l) : DCF 1:1 .....	63
Tabulka 21: Přehled měření (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD (1x10 <sup>-4</sup> mol/l) : DCF 1:1 .....	65
Tabulka 22: Přehled měření (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD (1x10 <sup>-3</sup> mol/l) : DCF 1:1 .....	66
Tabulka 23: Přehled měření (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD (1x10 <sup>-4</sup> mol/l) : DCF 1:1 .....	67
Tabulka 24: Přehled měření (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -CD (1x10 <sup>-4</sup> mol/l) : DCF medium 1:1 .....	69