

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Aneta Miklošínová

Stanovení nadroparinu v injekčním roztoku Fraxiparine technikami
průtokové analýzy

Determination of Nadroparine in Fraxiparine injection solution using
flow techniques of analysis

Diplomová práce

Vedoucí práce/Školitel: RNDr. Jakub Hraníček, PhD

Praha, 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne

Podpis

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá stanovením nadroparinu technikou sekvenční injekční analýzy (SIA) a průtokové injekční analýzy (FIA) s využitím fluorimetrické a spektrofotometrické detekce. Princip stanovení je založen na interakci nadroparinu s fenothiazinovým barvivem. Z fenothiazinových barviv byla použita methylenová modř. Stanovení probíhala na vlastní sestavené FIA aparatuře a na komerčním přístroji pro SIA. Optimální podmínky pro SIA byly: koncentrace barviva $6 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, dávkované objemy barviva a vzorku $100 \mu\text{l}$; průtoková rychlost $1,5 \text{ ml min}^{-1}$, pro FIA: koncentrace barviva $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; průtoková rychlost $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; dávkovaný objem vzorku $100 \mu\text{l}$, pro fluorimetrickou detekci bylo napětí detektoru nastaveno na 1000 V , Emise byla měřena s krokem 2 nm a excitační vlnová délka byla nastavena na 621 nm . Pro spektrofotometrickou detekci byla absorbance odečtena při vlnové délce absorpčního maxima. Opakovatelnost měření se pohybovala v rozmezí $2,01 - 2,85 \%$. Mez detekce u FIA byla $0,05 - 0,09 \text{ IU ml}^{-1}$ a u SIA byly zjištěny meze detekce v rozmezí $0,25 - 1,63 \text{ IU ml}^{-1}$, meze stanovitelnosti v rozmezí $0,83 - 5,44 \text{ IU ml}^{-1}$ a lineární rozsah od $0,5 - 20 \text{ IU ml}^{-1}$. Hodnoty bylo možné korigovat pomocí změny koncentrace a dávkovaného objemu fenothiazinového barviva.

Klíčová slova

Nadroparin, průtoková injekční analýza, sekvenční injekční analýza, fenothiazinová barviva, spektrofotometrie, fluorimetrie

Abstract

This thesis was focused on a determination of nadroparin using sequential injection analysis and flow injection analysis with fluorimetric and spectrophotometric detection. The principle of determination was based on the interaction of nadroparin with phenothiazine dye. Methylene blue was used as phenothiazine dye. The determination was performed on a laboratory made FIA instrument and on the commercial SIA instrument.

Optimal conditions for SIA were concentration of dye $6 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, injected volume $100 \mu\text{l}$, flowrate $1,5 \text{ ml min}^{-1}$, for FIA: concentration of dye $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ flowrate $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, injected volume = $100 \mu\text{l}$, for fluorimetric detection was sensitivity of the detector 1000 V, Emission was measured by 2 nm and excitation wavelength 621 nm. For spectrophotometric detection, absorbance was detected at the absorption maximum wavelength. Repeatability ranged from 2.01 to 2.85%. The limit of detection for FIA was $0.05\text{-}0.09 \text{ IU ml}^{-1}$, for SIA were limits of detection in range $0,25 - 1,63 \text{ IU ml}^{-1}$, limits of quantification in range $0,83 - 5,44$ and linear range was from $0,5 - 20 \text{ IU ml}^{-1}$. The limits of detection, limits of determination and the linear range could be corrected for the SIA by the injected volume of phenothiazine dye.

Key words

Nadroparin, flow injection analysis, sequential injection analysis, phenothiazine dyes, spectrophotometric detection, fluorimetric detection

Poděkování

Můj velký dík patří především mému školiteli a vedoucímu práce panu doktoru Jakobovi Hraníčkoví za cenné rady v laboratoři i při samotném zpracování. Dále patří můj dík studentům João Kleber Gonçalvesovi a Beatriz de Caroli Vizioli za pomoc při laboratorní práci.

Obsah

1.	Úvod.....	9
2.	Teoretická část	10
2.1.	Nadroparin	10
2.1.1.	Struktura a vlastnosti nadroparinu	10
2.1.2.	Způsoby stanovení nadroparinu.....	10
2.1.3.	Nízkomolekulární hepariny (LMWH).....	11
2.1.4.	Mechanismus působení heparinů	11
2.2.	Fenothiazinová barviva.....	12
2.2.1.	Fenothiazin	12
2.2.2.	Thionin	13
2.2.3.	Azur A	14
2.2.4.	Azur B	14
2.2.5.	Methylenová modř.....	15
2.2.6.	Interakce fenothiazinových barviv s nadroparinem.....	15
2.3.	Průtoková injekční analýza (FIA)	16
2.4.	Sekvenční injekční analýza (SIA)	17
2.4.1.	Specifikace a princip SIA	17
2.4.2.	SIA Lab-on-valve (SIA-LOV)	17
2.4.3.	mikro-SIA	18
2.4.4.	Bead injection (BI)	18
2.4.5.	Sekvenční injekční chromatografie (SIC)	19
3.	Experimentální část.....	21
3.1.	Použité chemikálie.....	21
3.2.	Použité přístroje.....	21
3.3.	Použitá aparatura	22
3.3.1.	FIA.....	22
3.3.2.	SIA.....	24
3.3.3.	Vyhodnocení výsledků	25
3.3.3.1.	Statické uspořádání	26
3.3.3.2.	FIA uspořádání.....	26
3.3.3.3.	SIA uspořádání.....	27
4.	Výsledky a diskuze	28
4.1.	Statické uspořádání se spektrofotometrickou detekcí	28
4.1.1.	Výběr fenothiazinového barviva a jeho koncentrace	28
4.1.2.	Vliv pH na stanovení nadroparinu.....	29

4.1.3.	Kalibrační závislost nadroparinu	29
4.2.	Statické uspořádání s fluorimetrickou detekcí.....	31
4.2.1.	Spektra methylenové modři.....	31
4.2.2.	Kalibrační závislost nadroparinu	33
4.3.	FIA uspořádání s fluorimetrickou detekcí.....	35
4.3.1.	Závislost jednotlivých parametrů – návrh experimentů	35
4.3.2.	Optimalizace parametrů.....	36
4.3.2.1.	Koncentrace methylenové modři	37
4.3.2.2.	Dávkovaný objem nadroparinu	38
4.3.2.3.	Průtoková rychlost	38
4.3.3.	Kalibrační závislost nadroparinu	40
4.3.4.	Opakovatelnost	40
4.4.	FIA uspořádání se spektrofotometrickou detekcí.....	41
4.4.1.	Optimalizace parametrů.....	41
4.4.2.	Kalibrační závislost nadroparinu	42
4.4.3.	Opakovatelnost	43
4.5.	SIA uspořádání s fluorimetrickou detekcí.....	43
4.5.1.	Optimalizace parametrů.....	43
4.5.1.1.	Optimalizace koncentrace methylenové modři.....	44
4.5.1.2.	Dávkovaný objem nadroparinu a methylenové modři	45
4.5.2.	Kalibrační závislost nadroparinu	46
4.5.3.	Opakovatelnost	47
4.6.	SIA uspořádání se spektrofotometrickou detekcí.....	48
4.6.1.	Optimalizace parametrů.....	48
4.6.2.	Kalibrační závislost	48
4.6.3.	Opakovatelnost měření.....	50
4.7.	Srovnání výsledků	51
5.	Závěr	53

Seznam zkratek a symbolů

APTT	(Activated partial thromboplastin time) aktivovaný částečný tromboplastinový čas
BI	Bead injection
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
FIA	(Flow injection analysis)
IU	(International unit) mezinárodní měrná jednotka pro množství účinné látky
LMWH	(Low molecular weight heparin) nízkomolekulární heparin
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit stanovitelnosti
MM	Methylenová modř
NAD	nadroparin
RNA	Ribonukleová kyselina
SIA	(Sequential injection analysis) sekvenční injekční analýza
SIA-LOV	(SIA-Lab-on-Valve) verze sekvenční injekční analýzy, kde detekce Probíhá přímo na ventilu
UFH	(Unfractionated heparin) nefrakcionovaný heparin
UV/VIS	Ultrafialová a viditelná oblast záření
A	Absorbance
a	Aktivita [IU ml ⁻¹]
$s_{y/x}$	Směrodatná odchylka, charakterizuje rozptýlení bodů okolo regresní přímky
U_{det}	Napětí, v této práci charakterizuje citlivost detektoru [V]
c	Koncentrace [mol dm ⁻³]
t	Čas [s]
V_d	Dávkovaný objem [μl]
v_p	průtoková rychlost [ml min ⁻¹]
λ_{ex}	Vlnová délka excitace [nm]
λ_{em}	Vlnová délka emise [nm]
λ_{max}	Vlnová délka maxima [nm]

1. Úvod

Nadroparin patří do skupiny nízkomolekulárních heparinů, je tedy důležitým antikoagulantem využívaným při léčbě onemocnění srážlivosti krve. Nesprávné dávkování však může mít vážné následky, neboť předávkování antikoagulačními činidly může v krajním případě způsobit i smrt.

Cílem této práce bylo vypracovat vhodné metody pro stanovení tohoto analytu ve vybraném léčivém přípravku pro účely kontroly jejího obsahu. Vybraná metoda by měla být spolehlivá, robustní, její analýzy by měly být rychlé, nenákladné a snadno automatizovatelné. Tyto podmínky splňují především metody průtokové analýzy, jako je průtoková injekční a sekvenční injekční analýza, proto byla pozornost zaměřena právě tímto směrem. Jako detekční techniky byly vzhledem k principu stanovení a vzájemného porovnání vybrány spektrofotometrie a fluorimetrie v UV/VIS oblasti.

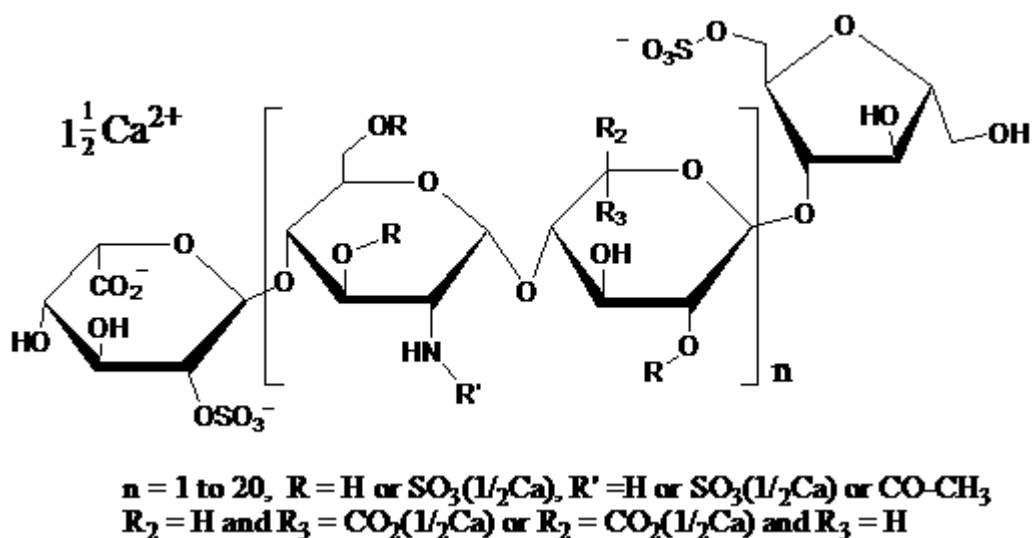
Tato práce porovnává stanovení nadroparinu dvěma průtokovými metodami – sekvenční injekční analýzou a průtokovou injekční analýzou a také dva druhy detekce – spektrofotometrickou a fluorimetrickou. Závěrem byla ještě provedena interferenční studie s vybranými organickými a anorganickými ionty.

2. Teoretická část

2.1. Nadroparin

2.1.1. Struktura a vlastnosti nadroparinu

Nadroparin je nízkomolekulární heparin získaný depolymerizací standardního heparinu. Jedná se o heterogenní směs sulfatovaných polysacharidových glykosaminoglykanových řetězců¹ s molekulovou hmotností okolo 4300 Da (75 – 90 % řetězců se molekulovou hmotností pohybuje v rozmezí 2000 – 9000 Da)². Modelová struktura nadroparinu je znázorněna na Obr. 2.1. Nadroparin se získává depolymerizací heparinu sodného, který se vyskytuje ve sliznicích prasat. Následuje proces extrakce, čištění a převedení na vápenatou sůl³. Výhodou užití nadroparinu, oproti použití nefrakcionovaného heparinu, je nízké riziko nežádoucího krvácení (<1%) a velmi nízké riziko trombocypenie (<0,001%)⁴. Nadroparin je účinnou alternativou k heparinu v léčbě profylaxí tromboembolických onemocnění, žilních trombóz, dále se využívá při ortopedických operacích a při hemodialýze^{4,2}. Vzhledem k různé délce řetězců se nedá přesně určit molekulová hmotnost nadroparinu a jeho aktivita se uvádí v jednotkách IU ml⁻¹ anti Xa¹, které vyjadřují míru působení proti faktoru Xa (viz kap. 2.1.4).



Obr. 2.1 Modelová struktura nadroparinu, řetězce mohou být různě dlouhé a mohou obsahovat různé disacharidové jednotky⁸.

2.1.2. Způsoby stanovení nadroparinu

Běžnou a jednoduchou metodou stanovení nadroparinu a dalších nízkomolekulárních heparinů pro účely kontroly kvality je jejich interakce

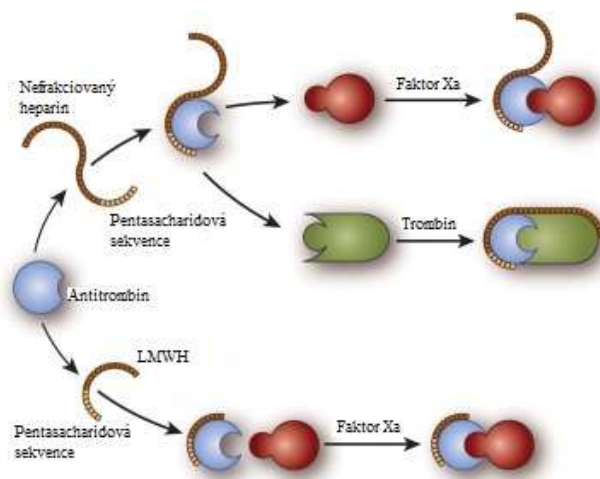
s fenothiazinovými barvivy. Metoda je založena na metachromatické interakci mezi záporně nabitými částmi molekul glykosaminoglykanů a kladně nabitými částmi molekul fenothiazinových barviv⁵. Další možností je reakce sulfátu zinečnatého s fenantrolinem a nadroparinem. V prostředí pufovaného roztoku se určí míra absorpance ultrafialového záření směsného roztoku, který obsahuje Zn^{2+} ionty, fenantrolin a nadroparinu vápenatý. Množství nadroparinu se stanoví kvantitativně⁶. Pro určení míry srážlivosti přímo z krve pacienta se nejčastěji stanovuje aktivovaný částečný tromboplastinový čas (APTT – activated partial thromboplastin time)⁷.

2.1.3. Nízkomolekulární hepariny (LMWH)

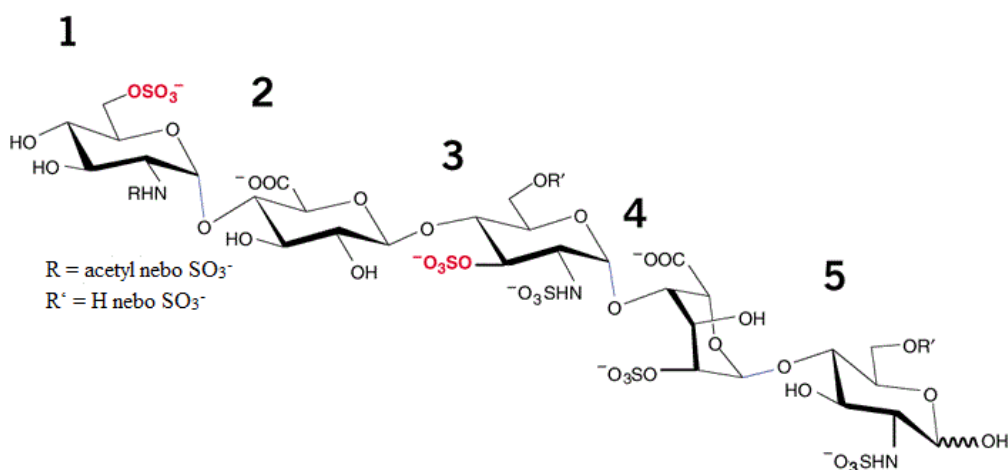
Nízkomolekulární hepariny (low molecular weight heparins, LMWH) se od nefrakcionovaného heparinu (unfractionated heparin, UFH) liší hlavně délkou řetězce a tedy i molekulovou hmotností. Toho je dosaženo štěpením nefrakcionovaného heparinu enzymaticky použitím heparinázy nebo jinými chemickými degradačními procesy⁸. U nefrakcionovaného heparinu se molekulová hmotnost pohybuje mezi zhruba od 3000 do 30 000 daltonů, u nízkomolekulárních heparinů má většina jednotek (~60%) hmotnost nižší než 8000 daltonů⁹. Mezi prakticky využívané nízkomolekulární hepariny patří nadroparin, dalteparin, enoxaparin, parnaparin, reviparin a sulodexid¹⁰.

2.1.4. Mechanismus působení heparinů

Mechanismus působení nízkomolekulárních heparinů a nefrakcionovaného heparinu se mírně liší. (Obr. 2.2) Nefrakcionovaný heparin se díky délce svého řetězce dokáže navázat jak na trombin, tak na faktor Xa. Jako faktor Xa je označován enzym, který hraje klíčovou roli v koagulační kaskádě, kde po aktivaci přeměňuje protrombin na trombin, který způsobí srážení krve¹¹. Nízkomolekulární hepariny se váží pouze na tento faktor (faktor Xa). Vazba je zprostředkována specifickou pentasacharidovou sekvencí (Obr. 2.3)¹². Ve srovnání s nefrakcionovaným heparinem mají LMWH díky tomuto mechanismu větší biologickou dostupnost, delší poločas rozpadu a vyšší antitrombotickou aktivitu¹³.



Obr. 2.2 Schéma mechanismu působení nefrakcionovaného heparinu a nízkomolekulárních heparinů¹⁴.



Obr. 2.3 Jednotky specifické pentasacharidové sekvence, která se váže na specifické místo antitrombinu.

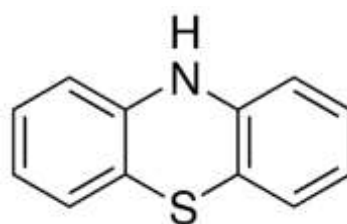
Názvy jednotek: 1- *N*-acetylglukosamin-6-*O*-sulfát nebo *N*-sulfatovanýglukosamin-6-*O*-sulfát; 2- kyselina glukuronová; 3- *N*-sulfatovanýglukosamin-3,6-disulfát nebo *N*-sulfatovanýglukosamin-3-*O*-sulfát-6-methanol; 4 – kyselina iduronová-2-*O*-sulfát; 5- *N*-sulfatovanýglukosamin-6-*O*-sulfát nebo *N*-sulfatovanýglukosamin-6-methanol¹⁵.

2.2.Fenothiazinová barviva

2.2.1. Fenothiazin

Fenothiazin je aromatická tricyklická sloučenina, která obsahuje jak atom dusíku, tak i atom síry. Vzorec fenothiazinu je znázorněn na Obr. 2.4. V tricyklickém chromoforu thiazinových a fenothiazinových barviv tvoří síra a dusík můstek mezi dvěma šestiuhlíkovými kruhy. Patří mezi kationtová barviva, protože delokalizace elektronů

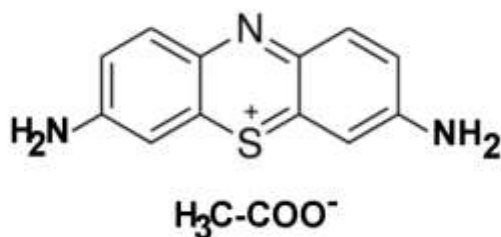
způsobuje parciální kladný náboj lokalizovaný na obou dusíkových atomech a síře¹⁶. Je původní molekulou mnoha léčiv a barviv, což jsou dvě hlavní skupiny chemických látek, do kterých spadají deriváty fenothiazinu¹⁷. Fenothiazinové deriváty substituované v poloze 2 a 10 patří hlavně do skupiny léčiv. Mimo jiné u nich byla zjištěna aktivita proti rakovinovým buňkám¹⁸. Dále mají léčiva na bázi fenothiazinu antiemetické, antipsychotické, antihistaminické a anticholinergické účinky¹⁹. Deriváty substituované v poloze 3 a 7 se využívají hlavně jako barviva. Patří mezi ně například methylenová modř, Azur A, Azur B a thionin¹⁶.



Obr. 2.4 Zjednodušený racionální konstituční vzorec fenothiazinu

2.2.2. Thionin

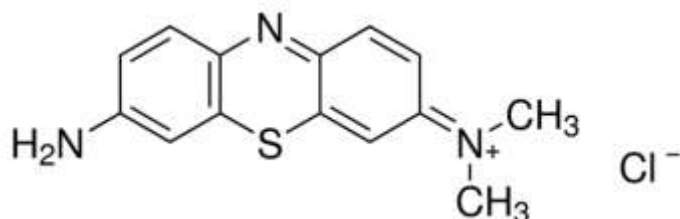
Thionin, systematickým názvem 3,7-diaminofenothiazin, je nejjednodušší fenothiazinové barvivo. Tvoří řadu solí, nejvíce využívané jsou v podobě chloridu a acetátu. Produktem kompletní methylace thioninu je methylenová modř, meziprodukty jsou Azur C, Azur A a Azur B¹⁶. I thionin našel široké uplatnění v barvení histologických a biologických preparátů a může být součástí Shiffova činidla, které se používá pro kvantitativní stanovení DNA Feulgenovou reakcí²⁰. Modelová struktura thioninu je znázorněna na Obr. 2.5



Obr. 2.5 Zjednodušený racionální konstituční vzorec thioninu

2.2.3. Azur A

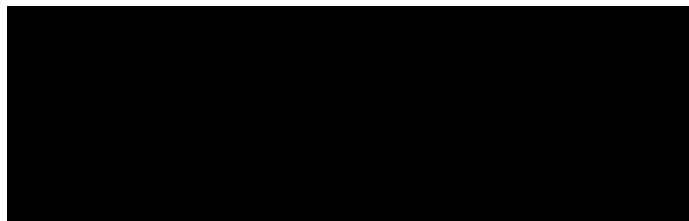
Azur A chlorid, systematickým názvem 3-amino-7-(dimethylamino)fenothiazin, je fenothiazinové barvivo dostupné jako zelený až zelenohnědý prášek. Jeho vzorec je zobrazen na Obr. 2.6. Získává se oxidací methylenové modři a je silně metachromatický²¹. Běžně se používá ke stanovení mukopolysacharidů²² a nově se hojně využívá v elektrochemii ve formě polymeru v modifikovaných elektrodách např. k neenzymatickému stanovení glukózy²³ nebo anorganických iontů jako např. Cu^{2+} [24].



Obr. 2.6 Zjednodušený racionální konstituční vzorec Azuru A

2.2.4. Azur B

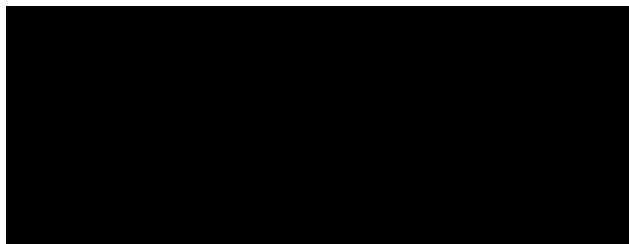
Azur B, komerčně dostupný ve formě chloridu, se systematickým názvem 3(dimethylamino)-7-(methylamino)fenothiazin, je další z fenothiazinových derivátů. Je složkou barviva Romanovského, které se používá pro barvení histologických preparátů a identifikaci malarických parazitů²⁵. Vzhledem k velmi podobné struktuře a vlastnostem s azurem A, má azur B podobné využití, např. u něj byla zjištěna interakce s RNA²⁶, používá se ke stanovení selenu²⁷ a používá se jako reagent v elektrodách, např. ke stanovení glukózy²⁸. Pro ilustraci je vzorec uveden na Obr. 2.7.



Obr. 2.7 Zjednodušený racionální konstituční vzorec Azuru B

2.2.5. Methylenová modř

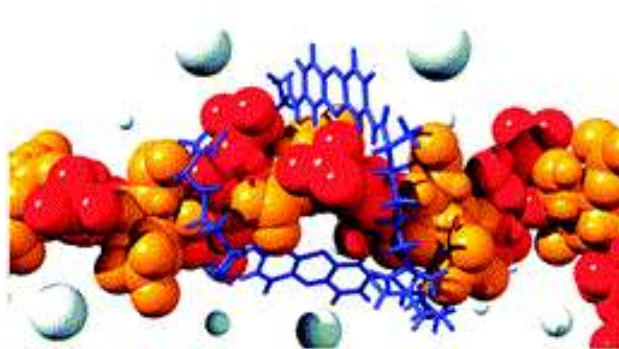
Methylová modř je kationtové barvivo modré až modrozelené barvy. Její systematický název je 3,7-bis(dimethylamino)fenothiazin. Struktura je znázorněna na Obr. 2.8. Má velmi širokou škálu využití, používá se jako redoxní indikátor, buněčné barvivo a v neposlední řadě také jako léčivo, hlavně jako antidotum při methemoglobinémii²⁹.



Obr. 2.8 Zjednodušený racionální konstituční vzorec methylenové modři

2.2.6. Interakce fenothiazinových barviv s nadroparinem

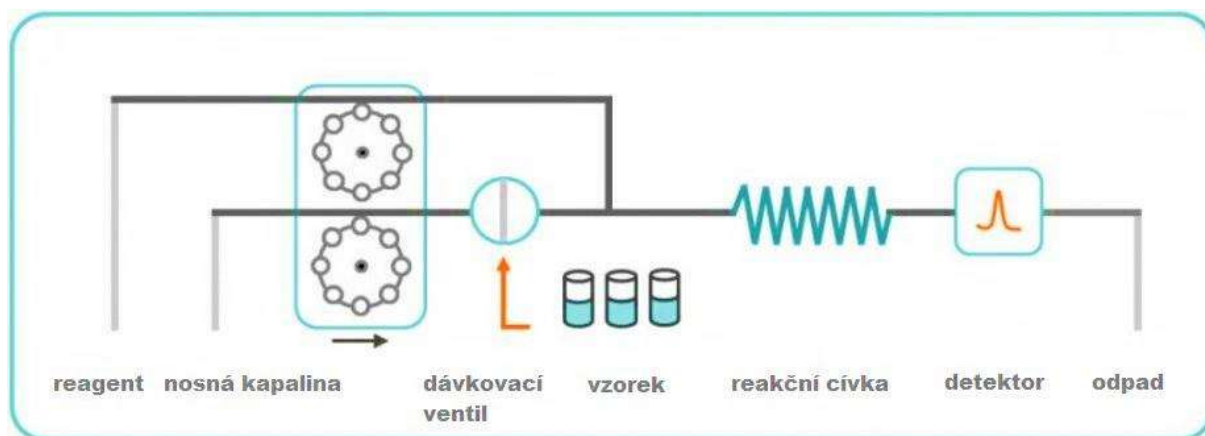
Interakce mezi nadroparinem a některými kationtovými barvivy ve vodném roztoku vede ke změnám v absorpčním spektru těchto barviv, typicky k poklesu absorbance nebo posunu absorpčního maxima. Tento jev se nazývá metachromazie a je využívám ke stanovení glykosaminoklykanů³⁰. Interakce mezi glykosaminoglykany a fenothiazinovými barvivy ale může být významně ovlivněna přítomností solí, kdy sůl vytvoří bariéru a částečně brání interakci mezi barvivem a glykosaminoglykanem³¹. Např. methylenová modř interaguje s nadroparinem jako monomer, při vysokých koncentracích barviva v roztoku se vytváří dimer, který prostorově znemožňuje se na nadroparinu navázat³². Příklad prostorového uspořádání je na Obr. 2.9.



Obr. 2.9 Prostorové znázornění interakce mezi nadroparinem a fenothiazinovým barvivem. Kladně nabitě části řetězce fenothiazinu jsou přitahovány k záporně nabitým částem molekul nadroparinu, čímž se vytvoří iontový asociát³³.

2.3. Průtoková injekční analýza (FIA)

Průtoková injekční analýza je první generací průtokových technik sestavená a popsána Ruzickou a Hansenem³⁴. Schéma možného uspořádání je zobrazeno na Obr. 2.10. Může být prováděna jak s konstantním tak s programovatelným průtokem. Její nejjednodušší variantou je vstříknutí zóny vzorku do nosného proudu reagentu a následné detekce vznikajícího produktu³⁵. Prvním krokem je nadávkování přesného objemu vzorku do proudu činidla. Jak se oblast vzorku pohybuje v proudu, disperze způsobí smíšení vzorku s činidlem, čímž se vytvoří reakční produkt. Rozsah smíchání a délka reakčního času se řídí průtokovou rychlostí, objemem a geometrií tubiček. Časový interval mezi vstříkáním vzorku a detekcí analytu je reprodukovatelný a díky tomu jsou všechny vzorky zpracovány stejným způsobem³⁶. Nadávkovaná zóna vzorku je během transportu v prostředí nosného toku rozmývána a koncentrace přítomného analytu dosahuje při průchodu detektorem parabolický profil. Vytvořený koncentrační gradient se významně axiálně rozšiřuje zejména při průchodu směšovací cívkou. Od počátku objevení uspořádání FIA až do dnešní doby bylo popsáno mnoho způsobů analýz látek různé povahy, v poslední době např. aktivita antioxidantů s chemiluminescenční detekcí³⁷, stanovení rtuťnatých iontů v kosmetických přípravcích³⁸, stanovení polyfenolických látek³⁹, enzymatické analýzy⁴⁰, stanovení nitrátů⁴¹.



Obr. 2.10 Schéma FIA uspořádání; vzorek je nadávkován do proudu reagentu, v mísicí cívce dojde ke smíchání a tvorbě produktu, který je detekován⁴².

2.4. Sekvenční injekční analýza (SIA)

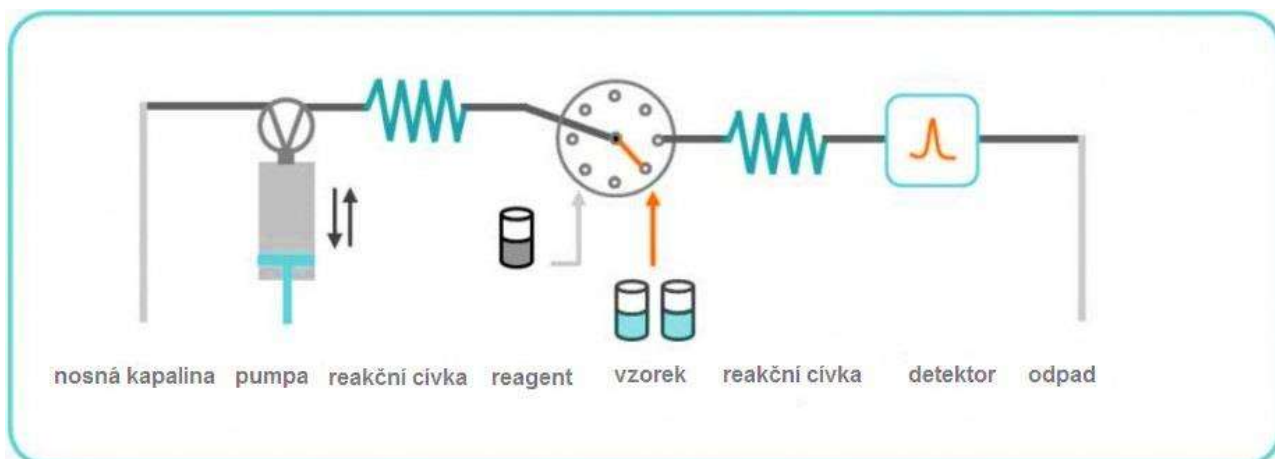
2.4.1. Specifikace a princip SIA

Sekvenční analýza je druhou generací technik průtokové injekční analýzy. Metoda je založena na vstřikování sekvence vzorků a reakčních činidel do proudu nosné kapaliny. V nejjednodušší konfiguraci se zóna vzorku a zóna reagentu vstřikují vedle sebe do proudu vody, popř. pufru. Během tohoto procesu zóny navzájem dispergují a na jejich rozhraní se vytváří produkt. Průtokový detektor zaznamenává změny v požadovaném parametru, když produkt dosáhne průtokové cely. Pístová pumpa umožňuje obousměrný tok kapaliny v aparatuře a tedy i efektivní promíchání zón³⁶. Na rozdíl od průtokové injekční analýzy, sekvenční analýza spotřebovává mnohem méně reakčních činidel a produkuje méně odpadu⁴³. Navíc je snadno programovatelná a automatizovatelná, protože nepotřebuje rekonfiguraci systému při aplikaci různých chemikálií. Všechny parametry, jako je objem vzorku a reagentu, průtoková rychlost, pořadí míchání a doba reakce, mohou být řízeny počítačem⁴⁴. Jedna z nevýhod sekvenční injekční analýzy je relativně malý počet analyzovatelných vzorků za jednotku času⁴⁵.

2.4.2. SIA Lab-on-valve (SIA-LOV)

SIA-LOV je třetí generací průtokových technik. Jádrem metody je počítačem řízený vícecestný ventil, jehož středový port je připojen přes reakční cívku na pístovou pumpu, která dávkuje vzorky a reagenty do nosného toku a následně do detektoru⁴⁶. Výhodou tohoto uspořádání je jeho kompaktnost a stálá poloha všech pracovních kanálů vzorku,

což zajišťuje vysokou opakovatelnost jednotlivých operací a možnost libovolného míchání činidel⁴⁷. SIA-LOV také umožňuje předúpravy vzorků on-line a je možné ji miniaturizovat a kombinovat s dalšími extrakčními nebo detekčními technikami, jako je například extrakce na pevné fázi (SPE) a jiné prekoncentrační metody⁴⁸. Schéma možného uspořádání je na Obr. 2.11.



Obr. 2.11 Příklad uspořádání SI-LOV. Systém může doplněn o komponenty jako je peristaltická pumpa, autosampler přídavná pístová pumpa atd. Celý systém pak může být ovládán počítačem popř. miniaturizován⁴².

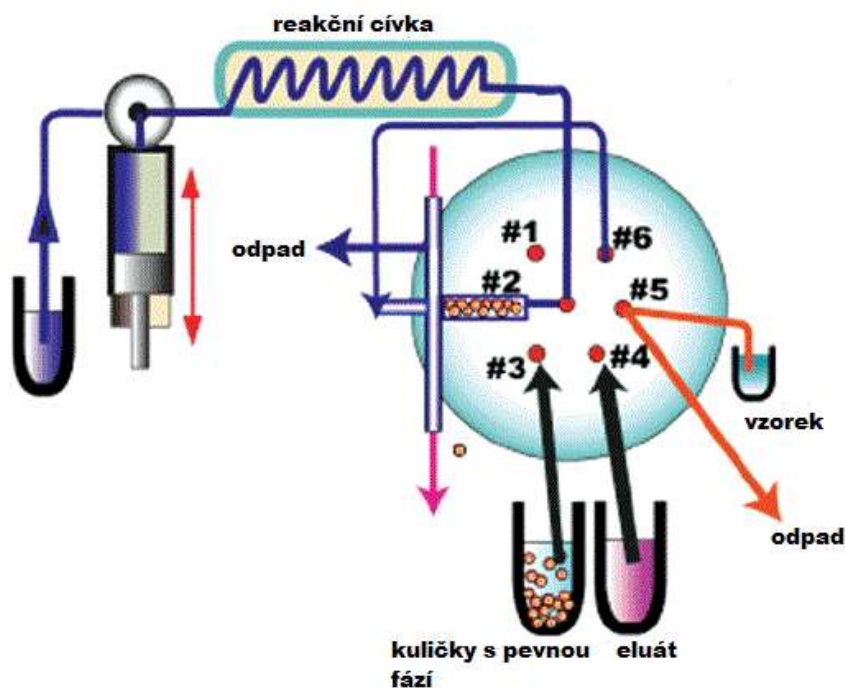
2.4.3. mikro-SIA

Další modifikací uspořádání sekvenční injekční analýzy je miniaturizace celé aparatury. Používá se v uspořádání lab-on-valve, které slouží jako vedení pro všechny mikrofluidní manipulace. mikro-SIA používá malé objemy činidel a vzorku (10 – 100 mikrolitrů na analýzu) a provádějí testy s vysokou rychlostí. Miniaturizovaný SIA instrument může být konfigurován s jednou pístovou pumpou a jednou mísicí cívkou nebo se dvěma pumpami a dvěma mísicími cívkami. Dvě pumpy jsou vhodnější pro analýzy, které vyžadují použití více než dvou činidel, separační kolonu nebo metodu difuzi plynů⁴⁹.

2.4.4. Bead injection (BI)

Bead injection kombinuje techniku sekvenční injekční analýzy ve formátu Lab-on-valve s extrakcí na pevné fázi (Obr. 2.12). Tato technika je založena na zachycení

přesného objemu perliček, které slouží jako nosič pevné fáze pro činidla nebo reaktivní skupiny, přímo do ventilu. Suspenze kuliček je zachycena na strategické pozici na ventilu, kde je následně konstantně omývána roztokem analytu, pufru nebo pomocného roztoku. Kuličky poté mohou být buď odstraněny a nahrazeny nebo obnoveny pro další analýzu. Produkty chemické reakce probíhající na povrchu kuliček mohou být analyzovány v reálném čase, buď přímo na pevné fázi nebo v eluované kapalině^{50,51}.

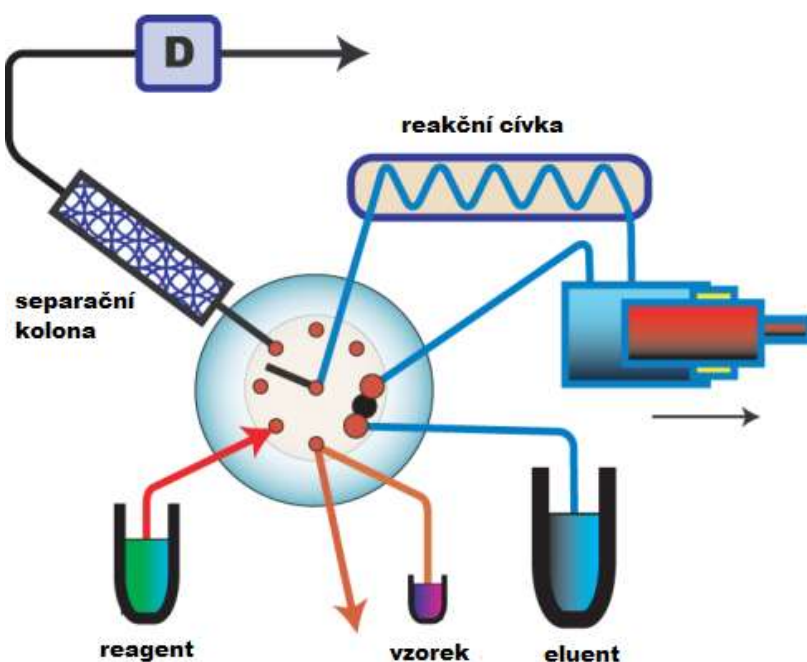


Obr. 2.12 Možné schéma uspořádání bead injection. Kuličky s pevnou fází jsou nasáty a uchyceny v systému. Produkt pak může být detegován přímo na kuličkách popřípadě v eluátu. Uspořádání jinak odpovídá SIA-LOV³⁶.

2.4.5. Sekvenční injekční chromatografie (SIC)

Sekvenční injekční chromatografie vznikla zavedením kapalinové chromatografie do SIA. Možná konfigurace aparatury je schematicky zobrazena na Obr. 2.13. SIC se může provádět ve formátu reverzní fáze, iontově výměnné chromatografie nebo afinitní chromatografie. Kolony jsou obvykle monolitické za použití středního tlaku nebo na mikrokolonách s použitím konvenčního nízkotlakého čerpadla, ale je možné použít i kolony s fused core částicemi. Metoda byla poprvé popsána v roce 2003 a úspěšně se projevila při analýze vícesložkových vzorků. Pro většinu aplikací je systém nejprve naplněn elučním roztokem, do kterého je definovanou průtokovou rychlostí nasáta zóna

vzorku. Vícecestný ventil je poté přepnut na port kolony, kam je vzorek přenesen pro separaci a detekci⁵².



Obr. 2.13 Schéma možného uspořádání sekvenční injekční chromatografie (SIC). Do aparatury SIA-LOV je zavedena krátká separační kolona, potřebný tlak zajišťuje střednětlaké nebo nízkotlaké čerpadlo³⁶.

Tab. 2.1 srovnání běžných parametrů metod průtokové injekční analýzy

parametr	FIA	SIA	μSI-LOV
objem vzorku, μl	50 - 500	50 - 200	10 - 30
dávkování vzorku	ruční/auto injekce	automatická injekce	automatická injekce
průměr vedení, mm	0,8	0,5 - 0,8	0,5 - 0,8
průtoková rychlost	0,5 - 1,0 ml min ⁻¹ kanál ⁻¹	řádově ml min ⁻¹	1 ml min ⁻¹
počet analýz za hodinu	< 120	< 60	< 60
spotřeba činidel	nízká	až 10x menší oproti FIA	minimální
geometrie toku	pouze přímý		programovatelný
čerpání činidel	kontinuální		přerušované
detekce	v rovnovážném stavu		v konstantním čase
uspořádání	i vícekanálové		pouze jednocanálové

3. Experimentální část

3.1. Použité chemikálie

Fraxiparine, nadroparin vápenatý 3 800 anti-Xa/0,4 ml (GlaxoSmithKline, Anglie)

Methylenová modř, [C₁₆H₁₈N₃SCI] p.a. Mr = 319,85 (Lachema, ČR)

Azur A [C₁₄H₁₄N₃SCI] p.a. Mr = 291,8 (Sigma Aldrich, USA)

Azur B [C₁₅H₁₆N₃SCI] p.a. Mr = 305,83 (Loba-Chemie, Indie)

Thionin [C₁₂H₉N₃S · C₂H₄O₂], ≥85 %, Mr = 287,34 (Sigma Aldrich, USA)

Kyselina dusičná, [HNO₃], p.a., 67 – 69% (Analytika, ČR)

D-glukóza monohydrát [C₆H₁₂O₆ · H₂O] p.a. Mr = 198,17 (Lachema, ČR)

Dihydrogencitrát draselný, [KH₂C₆H₅O₇], >99 %, Mr = 230,21; (SigmaAldrich, Německo)

Octan Sodný [CH₃COONa · 3H₂O] p.a. Mr = 136,08 (Lachema, ČR)

Standardní roztok chloridu draselného [NaCl] 1,000 ± 0,002 g dm⁻³ (Analytika, ČR)

Standardní roztok Mg v 0,5M HNO₃ 1000 mg dm⁻³ (Merck, Německo)

3.2. Použité přístroje

- **Spektrofotometr Agilent 8453** (Agilent Technologies, USA) s křemennou kyvetou pro statická měření s délkou optické dráhy 1,0 cm, ovládaný počítačovým programem UV-Visible ChemStation ver. 9.01.
- **Spektrofotometr QE65000** (Ocean Optics, USA) se světelným zdrojem DT-MINI-2-GS (Ocean Optics, USA) propojený s průtokovou Z-celou o délce absorpčního prostředí 1,0 cm optickými vlákny a ovládaný počítačovým programem SpectraSuite.
- **FIALab 3500** (FIALab, USA) s integrovaným detektorem ovládaný počítačovým programem FIALab for Windows ver. 5.0.
- **Peristaltická pumpa typ 78017-20** (Ismatec, USA).

- **Fluorimetr Aminco Bowman Series 2** (Aminco, USA) s křemennou kyvetou o délce absorpčního prostředí 1,0 cm pro statická měření a průtokovou kyvetou o objemu 450 μ l (Starna Scientific, Velká Británie) s délkou absorpčního prostředí 1,0 cm, ovládaný softwarem AB2.

- teflonové spojovací kapiláry o vnitřním průměru 0,5 a 0,8 mm (VICI Valco, USA) příslušných délek

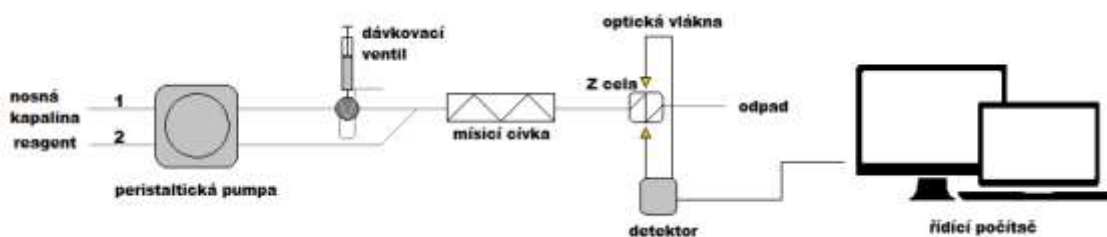
- mísicí a reakční cívky o různých objemech (vlastní výroba), tvořené teflonovými kapilárami (vnitřní průměr 0,5 mm; délek přibližně 50, 75 a 150 cm) stočenými do spirál

3.3. Použitá aparatura

3.3.1. FIA

Pro spektrofotometrické a poté i fluorimetrické stanovení nadroparinu byla sestavena aparatura pro průtokovou injekční analýzu. Aparatura se skládala peristaltické pumpy, dvoupolohového dávkovacího ventilu, dávkovací smyčky, mísicí cívky a průtokové cely. Spektrofotometrická detekce byla zajištěna spektrofotometrem QE 65000, který byl propojen s průtokovou celou ve tvaru „Z“ optickými vlákny. Systém byl spojen polyethylenovými tubičkami o vnitřním průměru 0,8 mm a teflonovými tubičkami o stejném průměru. FIA aparatura byla sestavena ve dvoukanálovém uspořádání, jedním kanálem byla čerpána deionizovaná voda a druhým kanálem bylo čerpáno fenothiazinové barvivo. Data byla vyhodnocována programem SpectraSuite. Fluorimetrická detekce byla zajištěna propojením sestavené FIA aparatury a fluorimetru Aminco Bowman Series 2. Byla použita křemenná průtoková kyveta o objemu 450 μ l. Sběr a vyhodnocení dat z fluorimetru zajišťoval program AB2.

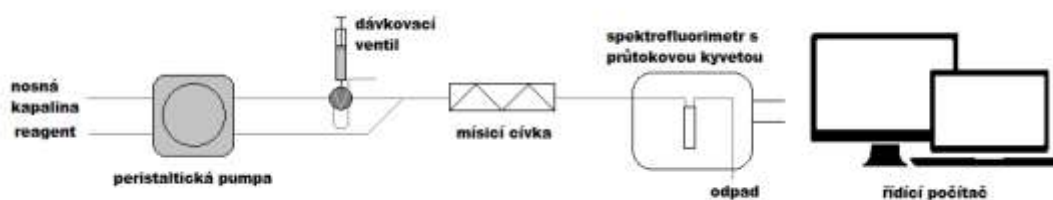
Konfigurace FIA aparatury je schematicky znázorněna na Obr. 3.1. Jako nosná kapalina byla použita deionizovaná voda, jako reagent bylo použito fenothiazinové barvivo.



Obr. 3.1 Schéma konfigurace FIA aparatury se spektrofotometrickou detekcí

Před zahájením série analýz byla aparatura vmyta 0,5% roztokem kyseliny dusičné a poté důkladně propláchnuta deionizovanou vodou. Na začátku analýzy byl do aparatury čerpán nosný roztok a reagent. Dávkovací ventil byl přepnut do polohy LOAD, kdy byla dávkovací smyčka propláchnuta přibližně 10násobkem vzorku (blanku). Poté byl ventil přepnut do polohy INJECT, kdy byl obsah smyčky nadávkován do směsi nosné kapaliny a fenothiazinového barviva. Zóna vzorku poté difunduje barvivem, v mísicí cívce se tento proces zintenzivní a při průchodu průtokovou „Z“ celou je měřena absorbance vzorku. Vzhledem k povaze stanovení dojde k poklesu absorbance oproti protékajícímu fenothiazinovému barvivu v místě vytvořeného produktu interakce nadroparinu s barvivem.

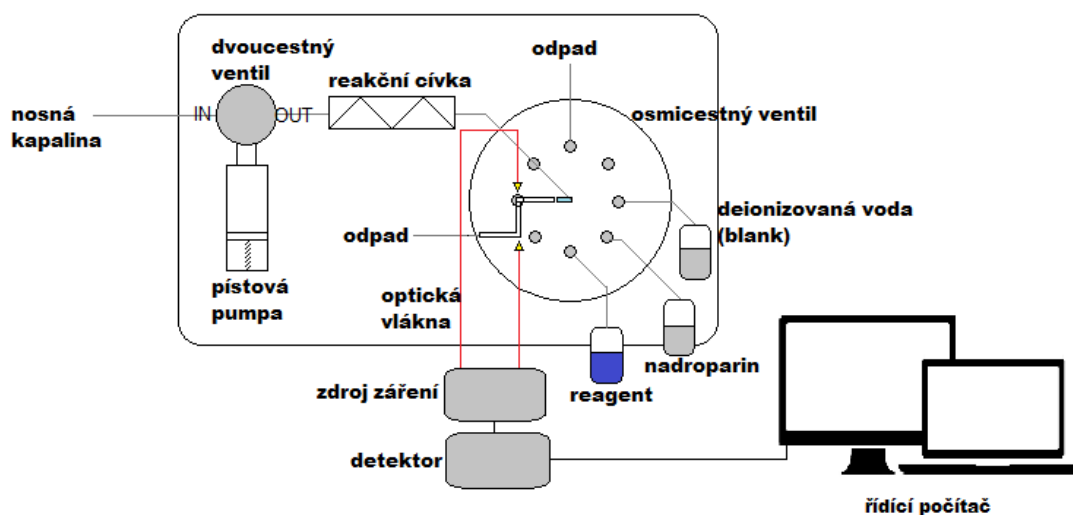
Pokles absorbance je úměrný aktivitě nadroparinu. Velmi podobným způsobem byly prováděny analýzy se fluorimetrickou detekcí a platí u ní výše zmíněný postup. Aparatura FIA byla napojena na fluorimetr, do kterého byla vložena průtoková kyveta propojená tubičkami s aparaturou. Takto bylo možné sledovat fluorescenci v reálném čase. Methylenová modř má fluorescenční vlastnosti na rozdíl od produktu interakce s nadroparinem, který fluorescenci zhasí. Úbytek je poté úměrný aktivitě nadroparinu. Schéma aparatury s fluorimetrickou detekcí je znázorněn na Obr. 3.2.



Obr. 3.2 Schéma konfigurace aparatury FIA s fluorimetrickou detekcí.

3.3.2. SIA

Další použitou aparaturou byla SIA s uspořádáním Lab-on-valve (LOV) se spektrofotometrickou detekcí. Schéma použité aparatury je zobrazeno na Obr. 3.3. Všechny průtokové cesty v aparatuře byly mezi sebou propojeny teflonovými tubičkami o průměru 0,5 mm, kapilára vedoucí od nosné kapaliny do pístové pumpy měla průměr 0,8 mm. Spektrofotometrická detekce probíhala v průtokové cele, která byla součástí osmicestného ventilu a byla spojena optickými vlákny se světelným zdrojem a externím UV/Vis spektrofotometrickým detektorem. Fluorimetrická detekce byla zajištěna, podobně jako u FIA, kombinací komerčního přístroje FIALab a fluorimetru Aminco Bowman Series 2. Detekce probíhala v průtokové křemenné kyvetě od výrobce Starna Scientific (Velká Británie).

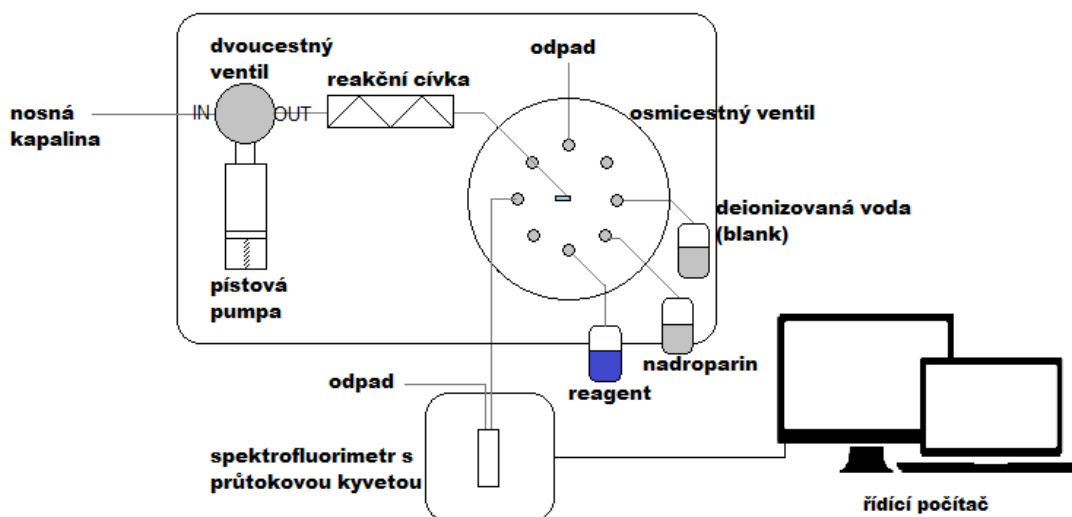


Obr. 3.3 Schéma aparatury SIA v uspořádání lab-on-valve, přístroj FIALab 3500 se spektrofotometrickou detekcí zajištěnou externím spektrofotometrem. Jako nosná kapalina byla použita deionizovaná voda a celý systém byl ovládán programem FIALab.

V programu FIALab pro Windows 5.0 byly vytvořeny příkazy tak, aby analýzy probíhaly následujícím způsobem. Dvoucestný přepínací ventil byl přepnut do polohy OUT (směrem k osmicestnému ventilu) a osmicestný ventil byl přepnut do polohy 3 a do aparatury byl nasán reagent. Po dokončení úkonu byl osmicestný ventil přepnut do polohy 6 a byl nasát vzorek (případně byl ventil přepnut do polohy 5 a byla nasáta deionizovaná voda pro blank). Po dokončení nasávání byl dvoucestný ventil přepnut do polohy IN (směrem k zásobníku s nosnou kapalinou) a pístová pumpa byla doplněna

vodou na objem jednoho mililitru. Poté byl přepínací ventil přepnut do polohy OUT, osmicestý ventil byl přepnut do polohy 2 (poloha průtokové cely) a celý objem byl vypuštěn skrz detekční celu a následně do odpadní nádoby. Poté bylo celé vedení, včetně detekční cely, propláchnuto jedním mililitrem nosné kapaliny, aby zbytky reakčních činidel nerušily další analýzu. Objemy dávkovaného vzorku a činidla, průtokové rychlosti a reakční časy byly takové, které byly zvoleny při optimalizaci parametrů.

Fluorimetrická detekce probíhala podobným způsobem, jako je popsáno výše. Po dokončení nasátí reagentu a vzorku a doplnění pístové pumpy na objem jednoho mililitru byl ventil přepnut do polohy OUT a osmicestý ventil byl přepnut do polohy 4. Tento port byl napojen na průtokovou kyvetu v externím fluorimetru, kde byl detegován produkt v reálném čase. Analytickým signálem byla míra zhášení fluorescence barviva, která byla úměrná množství nadroparinu. Schéma aparatury SIA se fluorimetrickou detekcí je znázorněna na Obr. 3.4.



Obr. 3.4 Schéma konfigurace SIA v uspořádání lab-on-valve s fluorimetrickou detekcí.

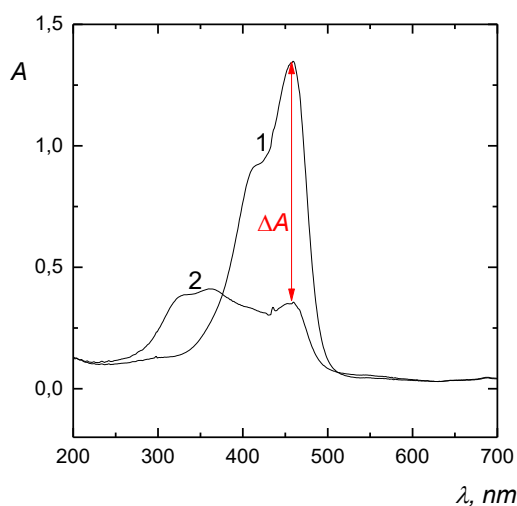
3.3.3. Vyhodnocení výsledků

Aby výsledky byly statisticky reprodukovatelné, byly všechny hodnoty měřeny celkem 3krát a jako výsledná hodnota byl použit medián. U měření opakovatelnosti byly hodnoty změřeny 10krát a byl použit aritmetický průměr naměřených hodnot. Výsledky byly vyhodnoceny programem OriginLab 9.0 a Microsoft Excel. Odlehlé výsledky byly vyřazeny ze zpracování, k potvrzení jejich odlehlosti byl použit Q-test.

Pro výpočet limitu detekce (LOD) a limitu stanovitelnosti (LOQ) byla nejdříve vypočtena chyba střední hodnoty ($s_{y/x}$) dané lineární závislosti. Pokud platí, že rovnice lineární závislosti je $y = B \cdot x + A$, potom limit detekce byl vypočten jako $LOD = (3 \cdot s_{y/x} - A)/B$ a limit stanovitelnosti jako $LOQ = (10 \cdot s_{y/x} - A)/B$.

3.3.3.1. Statické uspořádání

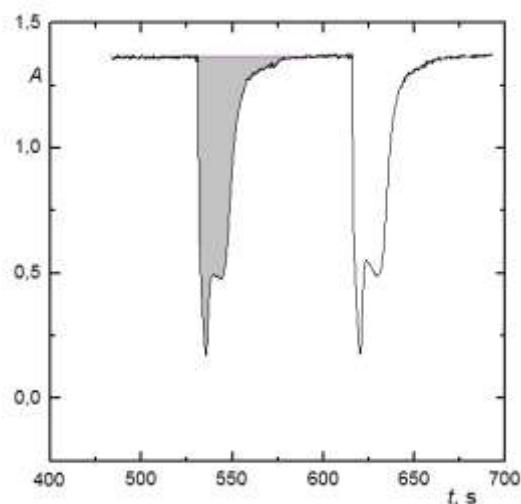
Pro statická uspořádání se spektrofotometrickou detekcí byl jako analytický signál použit rozdíl absorbance fenothiazinového barviva a absorbance barviva s přidavkem nadroparinu při vlnové délce maxima barviva. Na Obr. 3.5 je tento rozdíl znázorněn. Pro fluorimetrickou detekci byl použit stejný princip, pouze byl použit rozdíl intenzit fluorescence samotného barviva a barviva obsahující analyt.



Obr. 3.5. Zobrazení poklesu absorbance fenothiazinového barviva s přidavkem nadroparinu (2) oproti absorbanci roztoku samotného fenothiazinového barviva (1). Zde pro ilustraci jako fenothiazinové barvivo použit Azur B.

3.3.3.2. FIA uspořádání

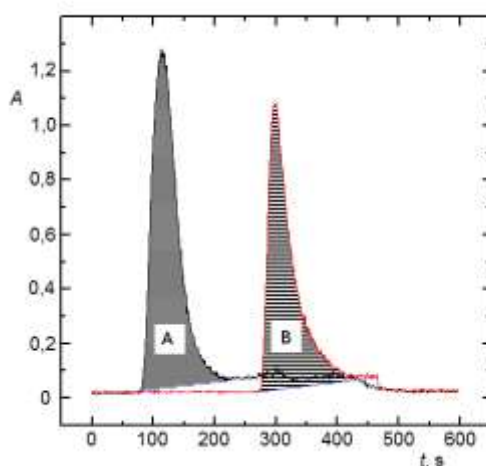
Pro FIA uspořádání se spektrofotometrickou detekcí byly jako signál použity plochy píku nadroparinu nadávkovaného do proudu fenothiazinového barviva a nosné kapaliny. Absorbance byla měřena při jedné vlnové délce v závislosti na čase. Ilustrativně je odečtení signálu znázorněno na Obr. 3.6. Pro FIA uspořádání s fluorimetrickou detekcí byl použit stejný princip odečtení signálu jako při spektrofotometrické detekci s tím rozdílem, že byla měřena fluorescence v závislosti na čase.



Obr. 3.6 Znázornění způsobu odečtení signálu u FIA se spektrofotometrickou detekcí. U FIA je signálem plocha záporného píku naznačená šedou barvou.

3.3.3.3. SIA uspořádání

Při SIA uspořádání byl použit jako analytický signál rozdíl plochy píku fenothiazinového barviva a fenothiazinového barviva s přídavkem nadroparinu. Při spektrofotometrické detekci byla měřena absorbance v závislosti na čase při vlnové délce absorpčního maxima. Na Obr. 3.7 je zobrazeno odečtení signálu. Při fluorimetrické detekci byl postup odečtení signálu identický se spektrofotometrickou detekcí, pouze byla sledována změna fluorescence v závislosti na čase.



Obr. 3.7 Znázornění odečtení signálu i SIA. Signálem byl rozdíl plochy píku fenothiazinového barviva (A) a fenothiazinového barviva s přídavkem nadroparinu (B).

4. Výsledky a diskuze

4.1. Statické uspořádání se spektrofotometrickou detekcí

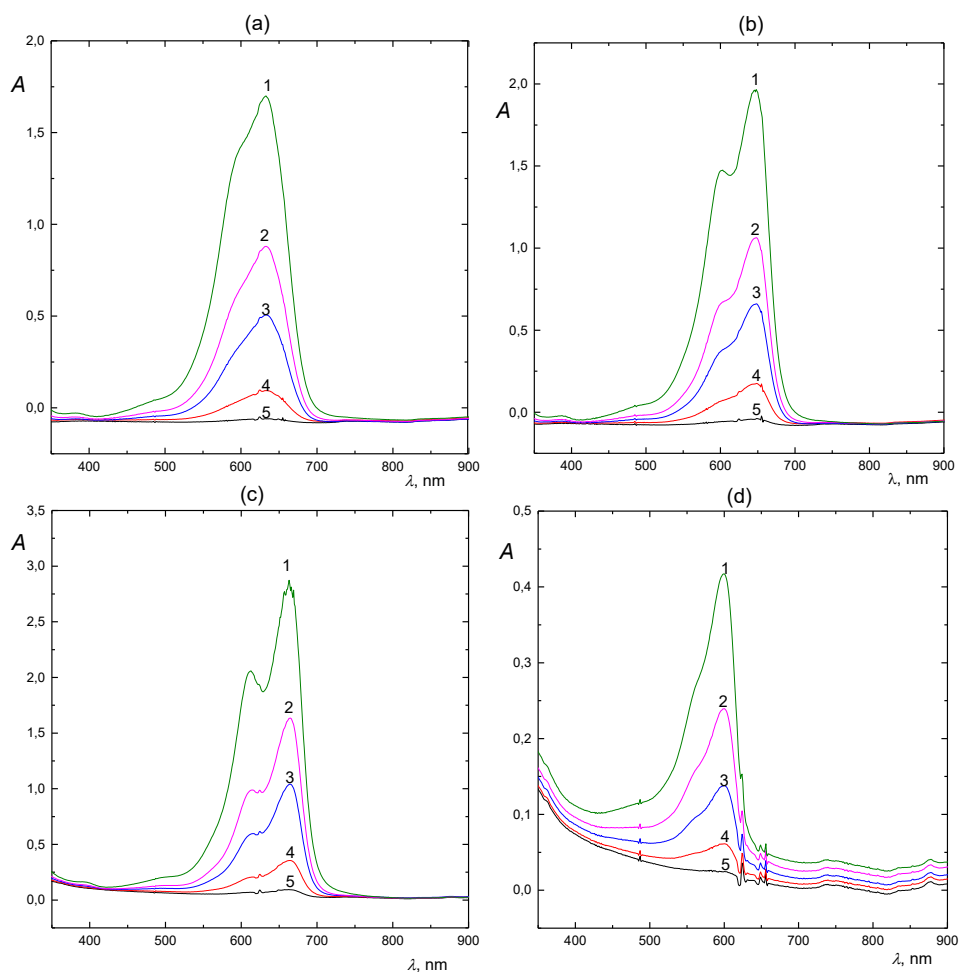
Nejprve byla provedena statická měření pomocí spektrofotometru a fluorimetru. Důvodem těchto měření byl výběr vhodného fenothiazinového barviva, které bude interagovat s nadroparinem a změna absorbance popř. fluorescence bude dostatečně velká. Také bylo potřeba zjistit přibližný rozsah koncentrací vybraného barviva pro průtoková měření. Výhodou statického uspořádání je malá spotřeba činidel a rychlá odezva, proto bylo toto uspořádání zvoleno k orientačním měřením.

4.1.1. Výběr fenothiazinového barviva a jeho koncentrace

Bylo testováno několik fenothiazinových barviv za účelem výběru vhodného barviva ke stanovení nadroparinu. Byla měřena absorpční spektra Azuru A, Azuru B, methylenové modři a thioninu. Použité koncentrace byly 0,1; 0,5; 1,5; 2,5 a $5 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} . Spektra všech barviv jsou znázorněna

Jako potenciálně vhodná barviva se ukázala být Azur A, Azur B a methylenová modř. Thionin byl vyhodnocen jako nevhodné fenothiazinové barvivo pro stanovení nadroparinu, protože by bylo nutné použít mnohem vyšší koncentraci oproti ostatním barvivům, vzrostla by tak jeho spotřeba. Navíc jeho základní linie nebyla pro všechny měřené koncentrace v rovině (v měřeném rozsahu vlnových délek), což by komplikovalo vyhodnocení výsledků. Proto již nebyl v dalších měřeních používán. Zvolené optimální koncentrace ostatních barviv pro další měření byly $6 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} pro Azur A; $5 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} pro Azur B a $3 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} pro methylenovou modř. Koncentrace byla vybrána tak, aby barvivo dosahovalo hodnoty absorbance mezi 1,5 – 2,0 absorbančních jednotek. To z důvodu, aby byl pokles při přidání nadroparinu dobře patrný.

Při dalších měřeních byl sledován pokles absorbance vlivem interakce s nadroparinem. Pokles byl odečten v místě absorpčního maxima, které bylo pro methylenovou modř při 664 nm, pro Azur A při 633 nm a pro Azur B při 647 nm, jak je patrné z Obr. 4.1.



Obr. 4.1 Jednotlivá absorpční spektra vybraných kationtových barviv Azur A (a); Azur B (b); Metylenová modř (c); Thionin (d). Použité koncentrace: $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (1); $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (2); $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (3); $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (4); $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (5). Všechna spektra byla měřena v rozmezí vlnových délek 350 – 900 nm.

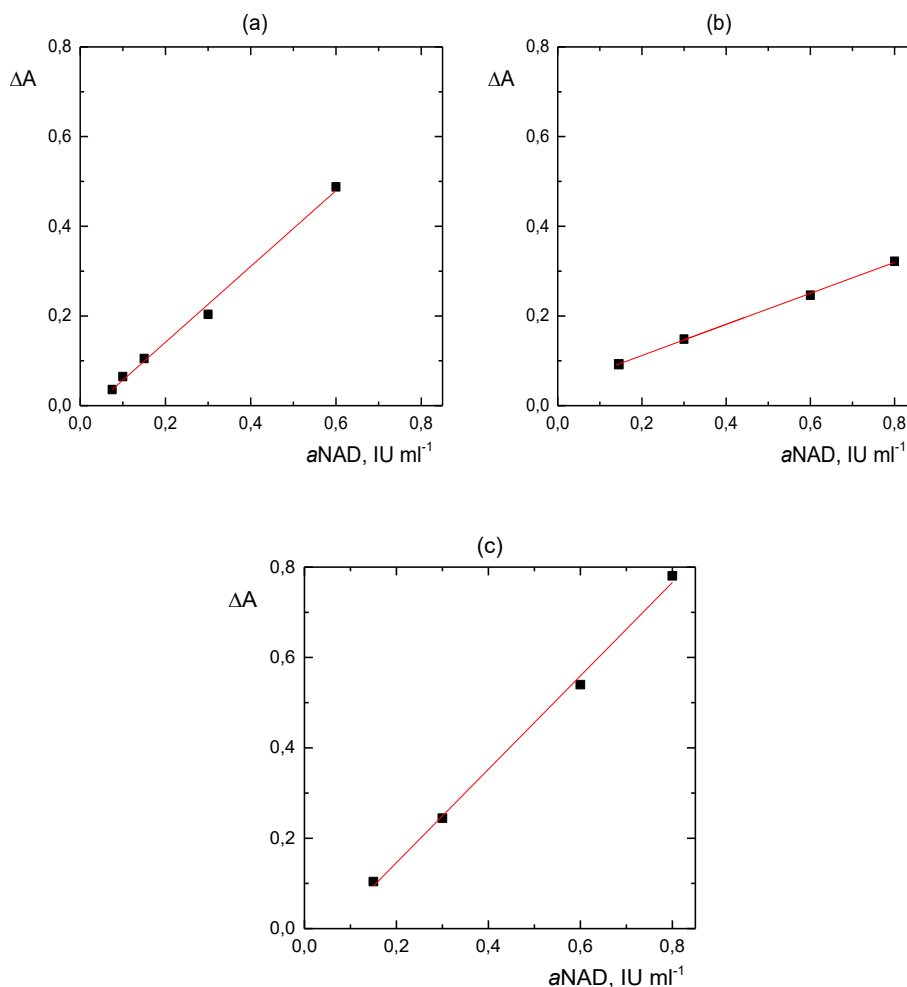
4.1.2. Vliv pH na stanovení nadroparinu

Pro zjištění vlivu pH na stanovení nadroparinu byla proměřena spektra methylenové modři o koncentraci $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ s nadroparinem o aktivitě 0,1; 0,5 a 1 IU ml⁻¹ v roztoku o hodnotách pH = 2, 4, 6, 8 a 10. Mezi spektry nebyl pozorován výrazný rozdíl, proto byla všechna další měření provedena v deionizované vodě.

4.1.3. Kalibrační závislost nadroparinu

Pro výběr vhodného barviva bylo nutné sestavit kalibrační závislost nadroparinu s použitím daného barviva. Kritériem pro výběr barviva byl i rozsah, ve kterém bude závislost lineární. Byly tedy sestaveny kalibrační závislosti nadroparinu v methylenové

modři, Azuru A a Azuru B o aktivitách 0,05; 0,075; 0,1; 0,15; 0,3; 0,6; 0,8; 5 a 15 IU ml⁻¹. Na Obr. 4.2 jsou zobrazeny lineární části křivek.



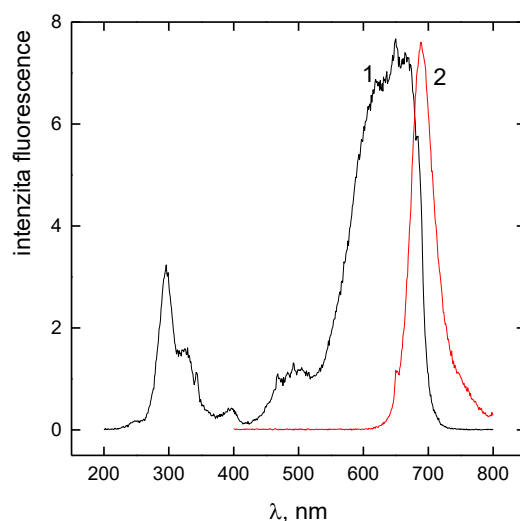
Obr. 4.2 kalibrační závislost nadroparinu v barvivech Azur A (a), Azur B (b), a methylenová modř (c). Použité koncentrace barviv byly pro Azur A $c = 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ pro Azur B $c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ a pro methylenovou modř $c = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Pro nadroparin byly u každého barviva měřeny aktivity: 0,05; 0,075; 0,1; 0,15; 0,3; 0,6; 0,8 IU ml⁻¹.

Na základě těchto závislostí byla jako nejvhodnější barvivo vybrána methylenová modř. Lineární část křivky byla v rozsahu aktivit nadroparinu od 0,15 do 0,8 IU ml⁻¹ a směrnice kalibrační závislosti byla měla nejvyšší hodnotu. Barvivo bylo použito v koncentraci $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, zatímco u ostatních barviv bylo potřeba pro stejnou hodnotu absorbance použít vyšší koncentrace.

4.2. Statické uspořádání s fluorimetrickou detekcí

4.2.1. Spektra methylenové modři

Na základě předchozích měření byla jako nejvhodnější barvivo zvolena methylenová modř, barviva Azur A a Azur B již dále nebyly používány. Pro fluorimetrickou detekci bylo nejprve potřeba určit vhodnou excitační vlnovou délku pro zjištění emisního spektra. Byla tedy měřena orientační emisní a excitační spektra methylenové modři (Obr. 4.3). Pro tyto účely byla vybrána methylenová modř o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.



Obr. 4.3 Excitační spektrum (1) a emisní spektrum (2) methylenové modři o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ s krokem 2 nm a citlivostí detektoru 850 V.

1-excitační spektrum methylenové modři 2-emisní spektrum methylenové modři

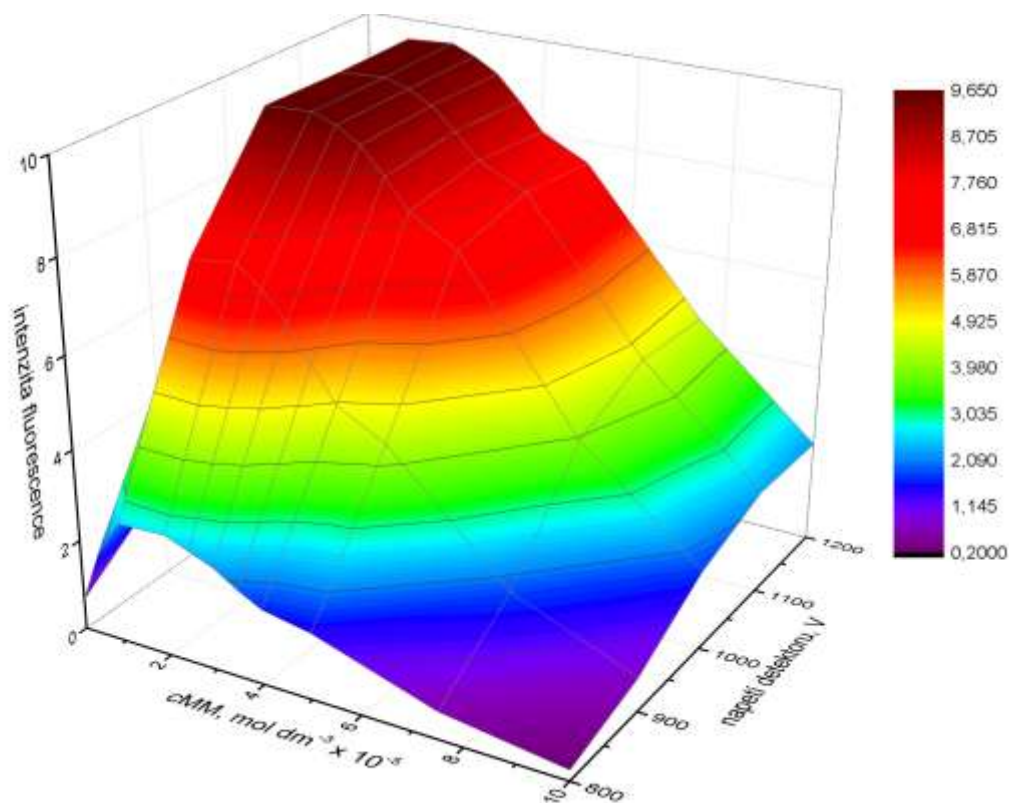
Na excitačním spektru barviva jsou dvě emisní vlnové délky, při kterých by bylo možné měřit emisní spektra a to 301 nm a 621 nm. Pro další měření byla zvolena excitační vlnová délka 621 nm, při které byla emise barviva maximální.

Poté byla sestavena kalibrační závislost methylenové modři za účelem výběru vhodné koncentrace pro další fluorimetrická měření. Byly připraveny roztoky methylenové modři o koncentracích 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 5,0; 7,5 a $10 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. U těchto koncentrací byla měřena intenzita fluorescence při různém

napětí na detektoru (800; 900; 1000; 1100 a 1200 V) vždy ve třech opakováních. Data jsou znázorněna v Tab. 4.1, kdy je již použit medián relativních intenzit fluorescence při daném napětí na detektoru. Zároveň je uvedena vlnová délka absorpčního maxima, která se zvyšuje s rostoucí koncentrací barviva. Tento jev je pravděpodobně způsobem interakcí mezi molekulami barviva, které mohou část energie pohltit. U vyšších koncentrací jsou interakce silnější/četnější, proto je vyzářená fluorescence posunuta k vyšším vlnovým délkám, tedy s nižší energií. Grafické znázornění všech naměřených výsledků je možné najít na Obr. 4.4.

Tab. 4.1 Relativní intenzita fluorescence různých koncentrací methylenové modři (MM) při různých napětí na detektoru.

$c \text{ MM, } \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$	Relativní intenzita fluorescence při daném napětí detektoru					$\lambda_{max}, \text{ nm}$
	800 V	900 V	1000 V	1100 V	1200 V	
0,1	0,663	2,070	4,394	5,197	5,048	682
0,5	1,834	5,290	8,302	8,461	8,322	684
1,0	2,640	7,230	9,579	9,543	9,564	687
2,0	2,692	7,374	9,635	9,602	9,631	692
2,5	2,483	6,965	9,448	9,444	9,427	692
3,0	2,282	6,391	9,136	9,184	9,130	695
3,5	1,946	5,614	8,581	8,721	8,615	695
4,0	1,666	4,880	7,967	8,201	8,031	696
5,0	1,473	4,316	7,355	7,714	7,521	696
7,5	0,611	1,831	3,928	4,632	4,523	700
10,0	0,243	0,760	1,760	2,288	2,242	702



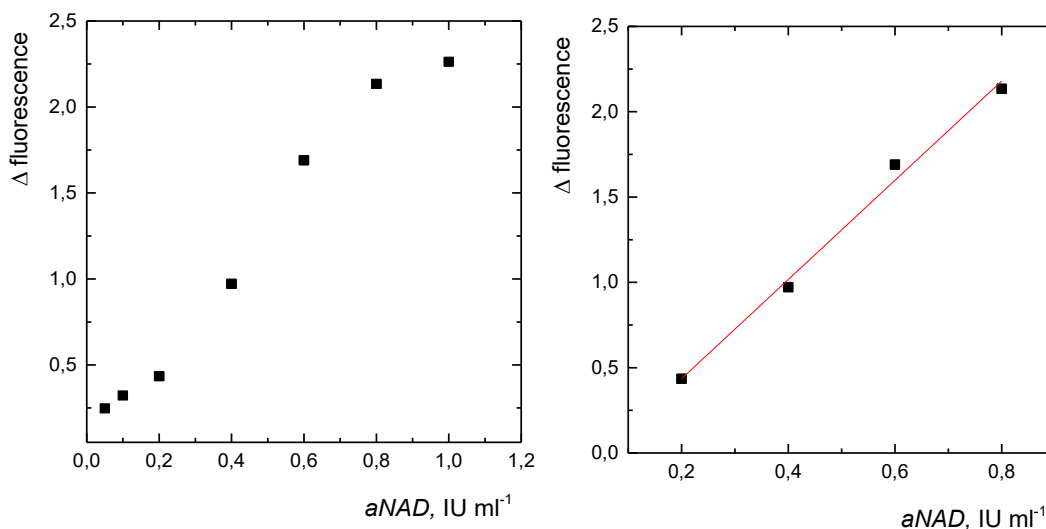
Obr. 4.4 Závislost relativní intenzity fluorescence na koncentraci methylenové modři ($0,1 - 10 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) a napětí na detektoru (800 – 1200 V). Emise měřena s krokem 2 nm, $\lambda_{ex} = 621 \text{ nm}$.

Pro další měření byla vybrána methylenová modř o koncentraci $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ a napětí na detektoru 1000 V. Při těchto parametrech je intenzita fluorescence nejvyšší, tudíž bude nejvíce zřetelný pokles intenzity fluorescence při přidání nadroparinu a zároveň nedochází k přetížení (saturování) detektoru.

4.2.2. Kalibrační závislost nadroparinu

Byla sestrojena kalibrační závislost nadroparinu s vybranou koncentrací methylenové modři v rozsahu koncentrací nadroparinu $0,05 - 1,0 \text{ IU ml}^{-1}$. Tyto koncentrace byly zvoleny na základě měření se spektrofotometrickou detekcí. Jako referenční signál byla použita čistá methylenová modř. Účelem tohoto měření bylo zjistit orientační rozsah koncentrací nadroparinu, které budou použity jako výchozí pro

průtoková měření. Na Obr. 4.5 je zobrazen trend této závislosti, která je lineární v oblasti aktivit nadroparinu od 0,2 do 0,8 IU ml⁻¹.



Obr. 4.5 Kalibrační závislost nadroparinu v rozsahu aktivit 0,05 – 1,0 IU ml⁻¹ (vlevo) a lineární část této kalibrační závislosti nadroparinu v rozsahu 0,2 – 0,8 IU ml⁻¹ (vpravo). Měřeno s $cMM = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ s citlivostí detektoru 1000 V, $\lambda_{ex} = 621 \text{ nm}$ s krokem 2 nm.

Dále byla proměřena i kalibrační závislost pro vyšší aktivity nadroparinu, a to od 0,8 do 10 IU ml⁻¹ s použitím stejných parametrů měření (s $cMM = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ a citlivostí detektoru 1000 V). V této oblasti aktivit již došlo k výraznému zakřivení kalibrační závislosti a pro aktivity od 7 do 10 IU ml⁻¹ bylo dokonce pozorováno postupné snižování rozdílů fluorescence mezi samotným barvivem a barvivem s rostoucím přídavkem nadroparinu. Důvodem tohoto jevu může být charakter interakce mezi nadroparinem a fenothiazinovým barvivem. Tato interakce je elektrostatická, pokud v roztoku dojde k přebytku nadroparinu, mohou řetězce nadroparinu začít interagovat mezi sebou, proto signál nejprve stagnuje a poté postupně klesá.

4.3.FIA uspořádání s fluorimetrickou detekcí

4.3.1. Závislost jednotlivých parametrů – návrh experimentů

Jedním z nejčastějších problémů experimentů je určení vlivu jednoho nebo více proměnné na jiné požadované proměnné. U většiny faktoriálních experimentů má každý faktor pouze dvě úrovně. Například s třemi parametry, z nichž každý má dvě úrovně se bude skládat z celkem 8 experimentů (8 kombinací jednotlivých parametrů).

Byl sestaven návrh experimentů pro zjištění vlivu jednotlivých parametrů. Za účelem zjištění vlivu proměnných parametrů v systému FIA byla použita experimentálního designu s třemi parametry o dvou úrovních, přičemž byl sledován vzájemný vliv tří proměnných parametrů: průtokové rychlosti, objemu dávkovací smyčky a koncentrace barviva, čímž se provádí osm experimentů kombinujících dvě úrovně. Vyšší úroveň označená jako -1 a nižší úroveň označená jako 1. Poté se vyhodnotí, jak má daný parametr a jeho kombinace vliv na plochu píku. Tabulka designu experimentů je zobrazena v Tab. 4.2 a výsledky návrhu experimentů jsou zobrazeny v Tab. 4.3. Experimenty probíhaly za následujících podmínek: průtoková rychlost (v_p) „1“ = 5 ml min^{-1} , „-1“ = 2 ml min^{-1} ; objem dávkovací smyčky (V_d): „1“ = 500 μl , „-1“ = 100 μl ; koncentrace methylenové modři c_{MM} : „1“ = $6 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} , „-1“ = $3 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} .

Tab. 4.2 Sestavení návrhu experimentů a závislost jednotlivých parametrů na sobě a jejich vliv na analýzu.

v_p [A]	V_d [B]	c_{MM} [C]	Interakce				Plocha píku	směrodatná odchylka
			AxB	AxC	BxC	AxBxC		
-1	-1	-1	1	1	1	-1	4,960	0,250
1	-1	-1	-1	-1	1	1	1,750	0,054
-1	1	-1	-1	1	-1	1	15,71	0,148
1	1	-1	1	-1	-1	-1	24,84	0,130
-1	-1	1	1	-1	-1	1	4,377	0,125
1	-1	1	-1	1	-1	-1	2,077	0,083
-1	1	1	-1	-1	1	-1	23,37	0,441
1	1	1	1	1	1	1	19,58	0,189

Tab. 4.3 Výsledky měření při návrhu experimentu a zjištění závislosti jednotlivých parametrů. Čím je rozdíl plochy píku vyšší, tím větší má parametr nebo jejich kombinace vliv.

parametr	plocha píku, s ⁻¹	odchylka
v_p [A]	-0,02	±0,11
V_d [B]	8,79	±0,09
c_{MM} [C]	0,27	±0,21
AxB	1,36	±0,12
AxC	-1,50	±0,15
BxC	0,33	±0,19
AxBxC	-1,73	±0,11

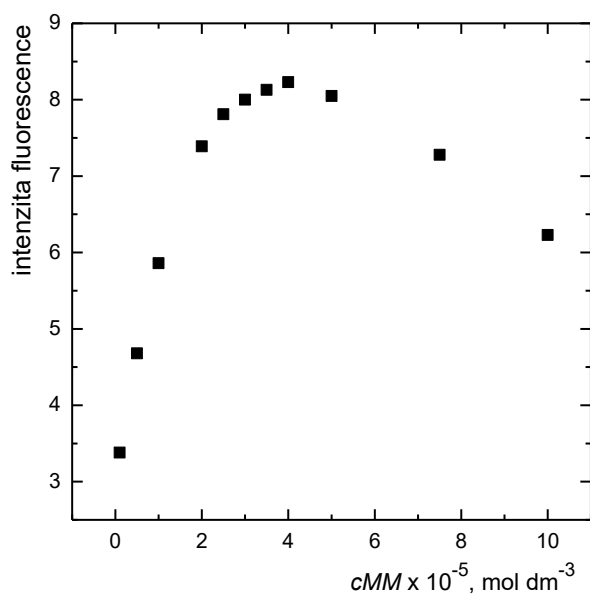
Z tabulky 4.3 je zřejmé, že nejdůležitějším parametrem je objem dávkovací smyčky a má i velký vliv v kombinaci s ostatními faktory. Je logické, že právě objem dávkovací smyčky má největší vliv na citlivost stanovení, vzhledem k tomu, že přímo ovlivňuje množství nadroparinu, které bude v aparatuře interagovat s methylenovou modří. Průtoková rychlost a koncentrace barviva nevykazují příliš velký vliv, přesto je ale potřeba provést optimalizaci těchto parametrů tak, aby nedocházelo k příliš velké spotřebě reagentu a výsledky byly reprodukovatelné.

4.3.2. Optimalizace parametrů

Vzhledem k tomu, že v kapitole 4.2.1. již byly optimalizovány parametry pro použitý fluorimetrický detektor, bylo rovnou přistoupeno k optimalizaci parametrů spojených s FIA uspořádáním, kterými byla koncentrace methylenové modří, průtoková rychlost a dávkovaný objem nadroparinu, resp. objem dávkovací smyčky. Napětí na detektoru bylo nastaveno na 1000 V a excitační vlnová délka byla konstantně nastavena na 621 nm.

4.3.2.1. Koncentrace methylenové modři

Nejprve bylo potřeba vybrat vhodnou koncentraci methylenové modři. Vzhledem k uspořádání FIA aparatury se předpokládá spotřeba zhruba dvojnásobně vyšší koncentrace, než jaká byla použita ve statickém uspořádání. Jedním kanálem byla pumpována deionizovaná voda a druhým kanálem byla pumpována methylenová modř. Vzhledem k tomu, že obě vedení byla stejně dlouhá, měla stejný vnitřní průměr a byla napojená na jednu peristaltickou pumpu, předpokládá se ředění 1 : 1 během analýz. Graf výsledků měření je zobrazen na Obr. 4.6.

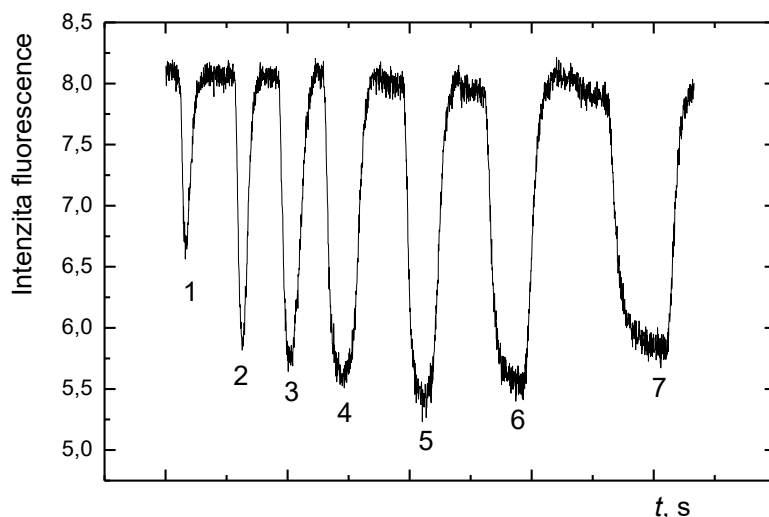


Obr. 4.6 Kalibrační závislost koncentrace methylenové modři na intenzitě fluorescence. Rozsah koncentrací byl 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 5,0; 7,5; $10 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Parametry měření; $V_d = 100 \mu\text{l}$; $U_{det} = 1000 \text{ V}$.

Ačkoliv nejvyšší intenzitu fluorescence vykazovala koncentrace methylenové modři $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, při průtoku aparaturou byla základní linie při této rychlosti viditelně více nestabilní než při nižších koncentracích, proto byla nakonec pro další měření zvolena koncentrace $3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, jejíž základní linie byla stabilnější s menší mírou šumu, a přesto poskytovala dostatečně intenzivní signál.

4.3.2.2. Dávkovaný objem nadroparinu

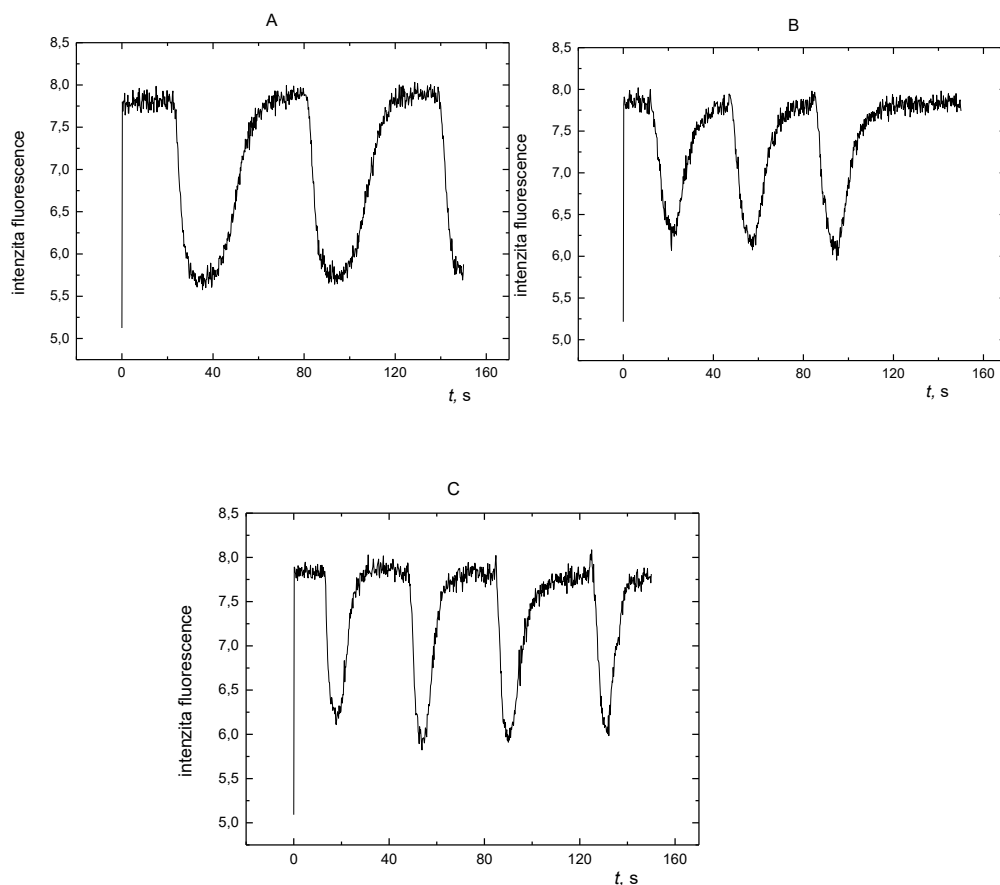
Dále bylo potřeba vybrat vhodný objem dávkovací smyčky. Byly vybrány objemy 20; 80; 100; 200; 250; 500 a 600 μl . Záznam měření je zaznamenán na Obr. 4.7. jako optimální byl zvolen objem dávkovací smyčky 100 μl , protože poskytoval dostatečně velký pokles signálu a na rozdíl od smyčky s objemem 80 μl měl nízké hodnoty směrodatné odchylky.



Obr. 4.7 Znáznorněný pokles fluorescence při optimalizaci objemu dávkovací smyčky pro dávkování nadroparinu do systému. *Byly měřeny následující objemy: 20 μl (1); 80 μl (2); 100 μl (3); 200 μl (4); 250 μl (5); 500 μl (6) a 600 μl (7). Parametry měření: $c_{MM} = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $U_{det} = 1000 \text{ V}$.*

4.3.2.3. Průtoková rychlost

Posledním měřeným parametrem byla průtoková rychlost. Vzhledem k tomu, že průtoková rychlost nemá příliš velký vliv na stanovení nadroparinu, jak bylo zjištěno během návrhu experimentů v kapitole 4.3.1., bylo měření spíše orientační. Byly změřeny odezvy při průtokových rychlostech 1,0; 2,0 a 3,0 ml min^{-1} ve třech opakováních. Záznamy jsou zobrazeny na Obr. 4.8.

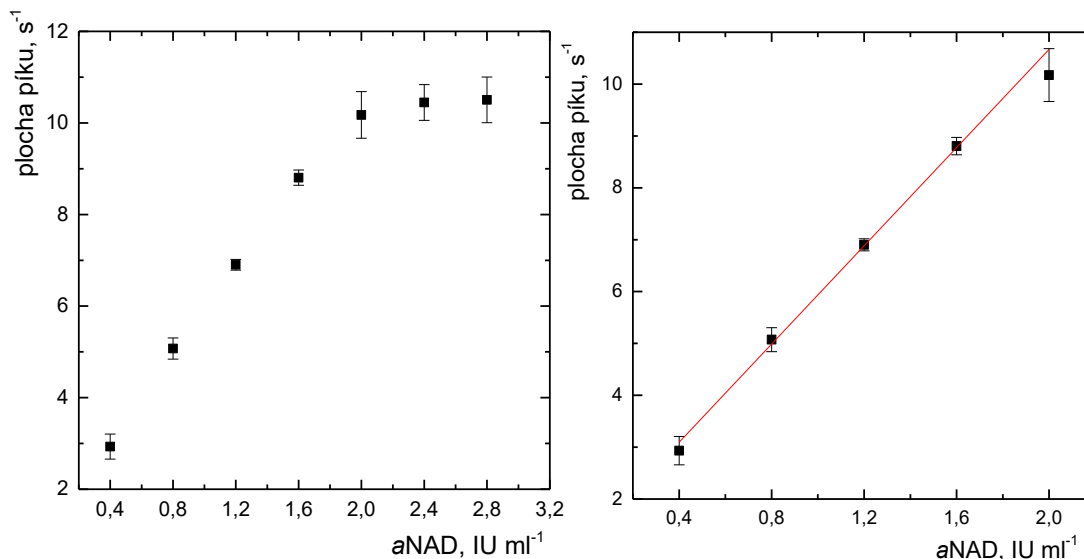


Obr. 4.8 Optimalizace průtokové rychlosti barviva a nadroparinu. $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ (A); $2,0 \text{ ml min}^{-1}$ (B); $3,0 \text{ ml min}^{-1}$ (C). *Parametry měření:* $cMM: 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $V_d = 100 \text{ } \mu\text{l}$; $U_{det} = 1000 \text{ V}$.

Při průtokové rychlosti $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ byly poklesy fluorescence nejvyšší, zároveň ale během 120 sekund bylo možné nadávkovat vzorek pouze dvakrát. Vzhledem k tomu, že všechna měření byla provedena ve třech opakováních, docházelo by k velké spotřebě reagentu. U průtokové rychlosti $2,0 \text{ ml min}^{-1}$ nebyly poklesy fluorescence tak výrazné, jako u nižší rychlosti, přesto byl pokles dostatečný a během 120 sekund bylo možné provést nadávkování vzorku třikrát. Průtoková rychlost $3,0 \text{ ml min}^{-1}$ vykazovala zhruba stejný pokles fluorescence jako rychlost $2,0 \text{ ml min}^{-1}$, výsledky ale byly více rozptýlené. Proto byla jako nejvhodnější vybrána průtoková rychlost $2,0 \text{ ml min}^{-1}$. Poskytovala 90 analýz za hodinu a zároveň vykazovala stabilní odezvy.

4.3.3. Kalibrační závislost nadroparinu

Při vybraných parametrech byla sestrojena kalibrační závislost nadroparinu za účelem zjištění limitu detekce, limitu stanovitelnosti a opakovatelnosti. Výsledky měření jsou graficky znázorněny na Obr. 4.9 a statické shrnutí se nachází v Tab. 4.4.



Obr. 4.9 Závislost plochy píku nadroparinu dávkovaného do proudu methylenové modři na aktivitě nadroparinu v rozsahu 0,4 – 2,8 IU ml⁻¹ (vpravo) a zdůraznění lineární části této závislosti (vlevo). *Parametry měření:* $cMM: 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $v_p = 2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; $V_d = 100 \mu\text{l}$; $U_{det} = 1000 \text{ V}$.

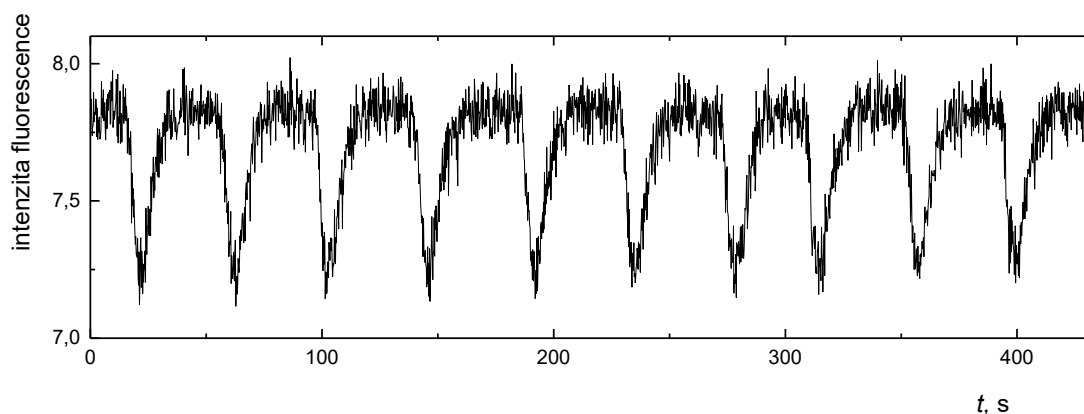
Tab. 4.4 Statistické vyhodnocení výsledků získaných ze závislosti z Obr. 4.10 vpravo.

Rovnice lin. regrese	$s_{y,x}$	LOD, IU ml ⁻¹	LOQ, IU ml ⁻¹
$y = 4,586x + 1,2373$	0,2762	0,09	0,33

4.3.4. Opakovatelnost

Pro zjištění opakovatelnosti byl 10krát změřen vzorek nadroparinu o aktivitě 1,5 IU ml⁻¹, protože ležel uprostřed lineární části kalibrační závislosti a měl nízkou hodnotu směrodatné odchylky. Ze změřených ploch píků byla dosazením do kalibrační rovnice vypočítána aktivita nadroparinu pro jednotlivá měření a opakovatelnost FIA stanovení

nadroparinu pak byla vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka těchto koncentrací. Záznam měření pro ilustraci opakovatelnosti se nachází na Obr. 4.10.



Obr. 4.10 Záznam měření opakovatelnosti při stanovení nadroparinu. *Podmínky měření:* $a_{NAD} = 1,5 \text{ IU ml}^{-1}$; $c_{MM} = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $v_p = 2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; $V_d = 100 \mu\text{l}$; $U_{det} = 1000 \text{ V}$.

Relativní směrodatná odchylka deseti měření činila 2,85 %, což je přijatelná hodnota pro tento typ stanovení. Na záznamu je ovšem vidět, že základní linie není příliš stabilní a vykazuje značný šum.

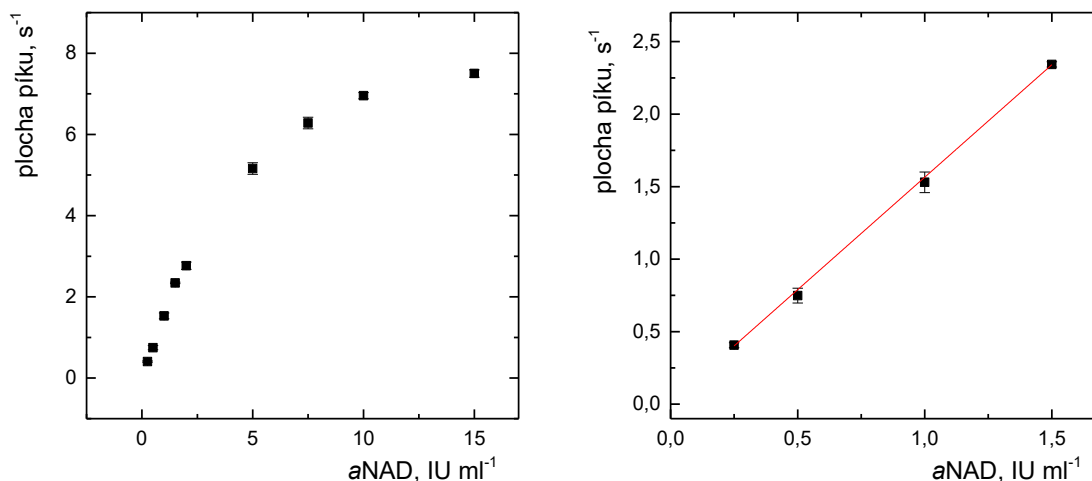
4.4.FIA uspořádání se spektrofotometrickou detekcí

4.4.1. Optimalizace parametrů

Vzhledem k tomu, že všechny parametry již byly optimalizovány jak pro námi použitou FIA aparaturu (kapitola 4.3.2.), bylo přistoupeno přímo k měření kalibrační závislosti nadroparinu. Použité hodnoty jednotlivých parametrů byly následující: koncentrace methylenové modři byla $3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, průtoková rychlost byla nastavena na $2,0 \text{ ml min}^{-1}$, objem dávkovací smyčky byl $100 \mu\text{l}$ a vlnová délka, při které byl sledován pokles absorbance, byla 664 nm .

4.4.2. Kalibrační závislost nadroparinu

Byla proměřena kalibrační závislost nadroparinu za podmínek vyhodnocených jako optimální. Kalibrační závislost výsledků měření je zobrazena na Obr. 4.11.



Obr. 4.11 Kalibrační závislost plochy píku nadroparinu do proudu methylenové modři na aktivitě nadroparinu v rozmezí 0,25 – 15 IU ml⁻¹ (vlevo) a zdůraznění lineární části této závislosti s proložením (vpravo). *Podmínky měření:* $cMM = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $v_p = 2 \text{ ml min}^{-1}$; $V_d = 100 \mu\text{l}$, $\lambda_{max} = 664 \text{ nm}$.

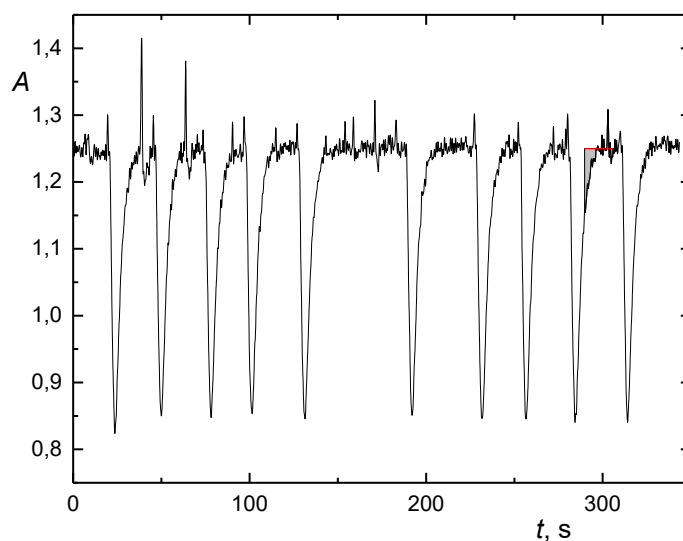
Kalibrační závislost má spíše exponenciální charakter, část této závislosti v oblasti nižších aktivit nadroparinu je ovšem lineární, což je žádanější varianta. Statistické zhodnocení výsledků se nachází v Tab. 4.6. Pokud tedy bude k účelům analýzy stačit úzké rozmezí aktivit nadroparinu, je vhodné použít lineární část této závislosti, pokud by byla potřeba rozšířit toto rozmezí, je vhodnější použít pro stanovení parabolickou křivku.

Tab. 4.6 Statistické zhodnocení výsledků

rovnice lin. reg.	$s_{y/x}$	LOD, IU ml ⁻¹	LOQ, IU ml ⁻¹
$y = 1,5615x - 0,0074$	0,0247	0,05	0,16

4.4.3. Opakovatelnost

Pro zjištění opakovatelnosti výsledků bylo provedeno stanovení nadroparinu o aktivitě $1,5 \text{ IU ml}^{-1}$ desetkrát za sebou pomocí methylenové modři o koncentraci $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ za stejných podmínek a to takových, které byly určeny jako optimální (objem dávkovací smyčky $100 \mu\text{l}$ a průtoková rychlost při měření 2 ml min^{-1}). Ze změřených ploch píků byla dosazením do kalibrační rovnice vypočítána aktivita nadroparinu pro jednotlivá měření. Záznam měření opakovatelnosti je na Obr. 4.12.



Obr. 4.12 Záznam měření opakovatelnosti na FIA se spektrofotometrickou detekcí.

Podmínky měření: $a_{\text{NAD}} = 1,5 \text{ IU ml}^{-1}$, $c_{\text{MM}} = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; $v_p = 2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; $V_d = 100 \mu\text{l}$, $\lambda_{\text{max}} = 664 \text{ nm}$.

Relativní směrodatná odchylka měření byla 2,64 %. Ze záznamu je ale vidět, že podobně jako fluorimetrické detekce, je základní linie nestabilní.

4.5.SIA uspořádání s fluorimetrickou detekcí

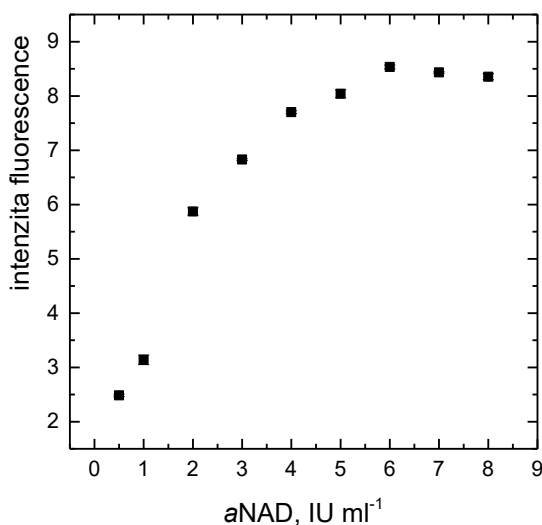
4.5.1. Optimalizace parametrů

V této části práce byly optimalizovány následující parametry: dávkovaný objem methylenové modři, koncentrace methylenové modři, průtoková rychlost a dávkovaný objem nadroparinu. Parametry související s nastavením detektoru již zůstaly konstantní.

Excitační vlnová délka byla nastavena na 621 nm, emisní vlnová délka na 624 nm a citlivost detektoru zůstala nastavena na 1000 V.

4.5.1.1. Optimalizace koncentrace methylenové modři

Pro SIA aparaturu byla optimalizována koncentrace methylenové modři. Důvodem tohoto měření bylo zjistit, při které koncentraci barviva bude rozdíl mezi plochou píku barviva a plochou píku barviva s přidavkem nadroparinu největší. Grafické znázornění výsledků měření se nachází na Obr. 4.13.



Obr. 4.13 graf výsledků měření optimalizace koncentrace methylenové modři. *Byly měřeny koncentrace 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 a 8,0 · 10⁻⁵ mol dm⁻³. $v_p = 25 \mu\text{l s}^{-1}$ (1,5 ml min⁻¹), $V_d = 100 \mu\text{l}$, $U_{det} = 1000 \text{ V}$, $\lambda_{ex} = 621 \text{ nm}$.*

Nejvyšší intenzitu fluorescence poskytovala methylenová modř o koncentraci $6 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, její směrodatná odchylka se nijak zvlášť nelišila od ostatních, proto byla vybrána pro další měření. Za povšimnutí stojí, že koncentrace barviva vyhodnocená jako optimální pro aparaturu FIA byla téměř dvojnásobně nižší. Lze to vysvětlit tím, že při analýzách FIA barvivo proudilo po celou dobu měření v aparatuře a do tohoto proudu byla dávkována zóna analytu, bylo tedy potřebné, aby absorbance samotného roztoku methylenové modři byla stabilní v čase. V SIA analýzách byla methylenová modř spolu s nadroparinem dávkována do proudu deionizované vody, docházelo tak

k většímu ředění barviva. Vzhledem k povaze techniky SIA, ani vyšší koncentrace barviva nezpůsobí velkou spotřebu reagentu.

4.5.1.2. Dávkovaný objem nadroparinu a methylenové modři

K nalezení optimálních hodnot dávkovaných objemů methylenové modři a nadroparinu byly proměřeny dávkované objemy 50, 100 a 200 μl v různých kombinacích, jak pro barvivo, tak pro nadroparin. Účelem tohoto měření bylo najít takový dávkovaný objem barviva a reagentu, který bude poskytovat největší rozdíl plochy píku mezi methylenovou modří dávkovanou s blankem (deionizovanou vodou) a methylenovou modří dávkovanou s nadroparinem. Zároveň byl kladen důraz na to, aby spotřeba barviva a nadroparinu nebyla příliš vysoká. V Tab. 4.7 jsou shrnuty výsledky tohoto měření.

Tab. 4.7 Optimalizace nasávaného objemu methylenové modři a nadroparinu. V tabulce jsou zaznamenány rozdíly plochy píku pro blank a vzorek v závislosti intenzitě fluorescence na čase (ΔF)

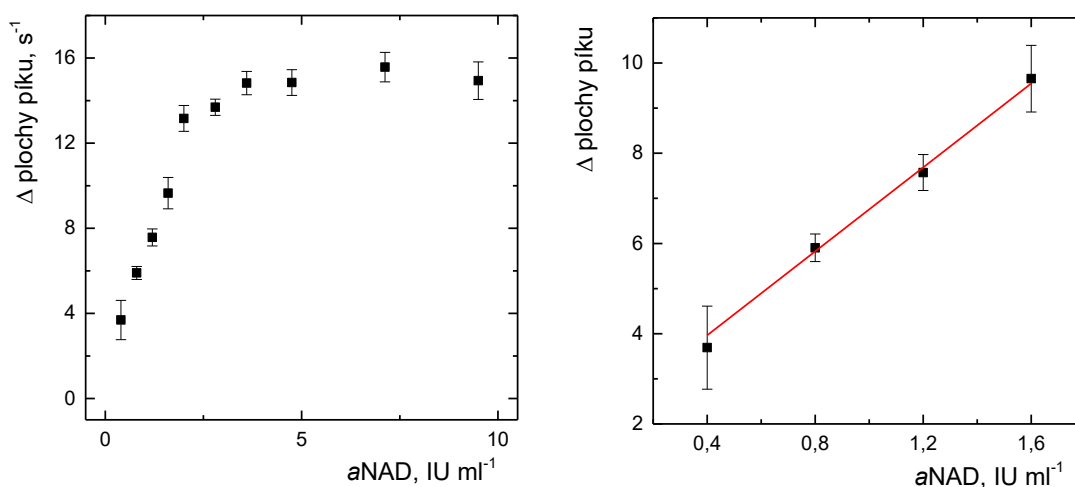
		Nadroparin $a = 2.8 \text{ IU ml}^{-1}$		
		50 μL	100 μL	200 μL
methylenová modř $c = 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$	50 μL	11,044	7,400	3,559
		10,797	7,621	1,662
		10,085	5,926	2,39
	medián ΔF	10,797	7,400	2,39
	s. odchylka	0,407	0,752	0,781
	100 μL	19,235	-*	8,617
		19,387	20,393	6,671
		16,118	20,163	8,303
	medián ΔF	19,235	20,278	8,303
	s. odchylka	1,507	0,115	0,853
	200 μL	5,231	10,821	15,468
		9,102	9,584	-*
7,327		11,986	15,514	
medián ΔF	7,327	10,821	15,491	
s. odchylka	1,582	0,981	0,023	

* hodnoty byly Q-testem vyřazeny pro odlehlost

Z výsledků je zřejmé, že záleží hlavně na poměru dávkovaného objemu nadroparinu a methylenové modři. Nejvyšší rozdíl plochy píku mezi methylenovou modří s blankem a methylenovou modří s nadroparinem poskytoval dávkovaný objem 100 μl barviva : 100 μl nadroparinu. Navíc hodnoty směrodatné odchylky byly velmi nízké, proto tento poměr dávkovaného objemu použit pro další měření.

4.5.2. Kalibrační závislost nadroparinu

Byla proměřena kalibrační závislost nadroparinu. Byly proměřeny koncentrace 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0; 2,8; 3,6; 4,75; 7,25 a 9,5 IU ml^{-1} . Účelem tohoto měření bylo zjištění hodnot limitu detekce, limitu stanovitelnosti a odchylky měření. Parametry měření byly použity takové, které byly již dříve vyhodnoceny jako optimální, tedy: $c_{\text{MM}} = 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, průtoková rychlost $25 \mu\text{l s}^{-1}$ ($1,5 \text{ ml min}^{-1}$), dávkovaný objem methylenové modři 100 μl , napětí na detektoru bylo nastaveno na 1000 V, excitační vlnová délka byla konstantně nastavena na 621 nm a emisní vlnová délka byla nastavena na 624 nm. Na Obr. 4.14 je grafické znázornění výsledů tohoto měření.



Obr. 4.14 Kalibrační závislost nadroparinu při stanovení pomocí methylenové modři.

Použité parametry: $c_{\text{MM}} = 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $v_p = 25 \mu\text{l s}^{-1}$ ($1,5 \text{ ml min}^{-1}$), $V_d \text{NAD} = 100 \mu\text{l}$, $U_{\text{det}} = 1000 \text{ V}$, $\lambda_{\text{ex}} = 621 \text{ nm}$.

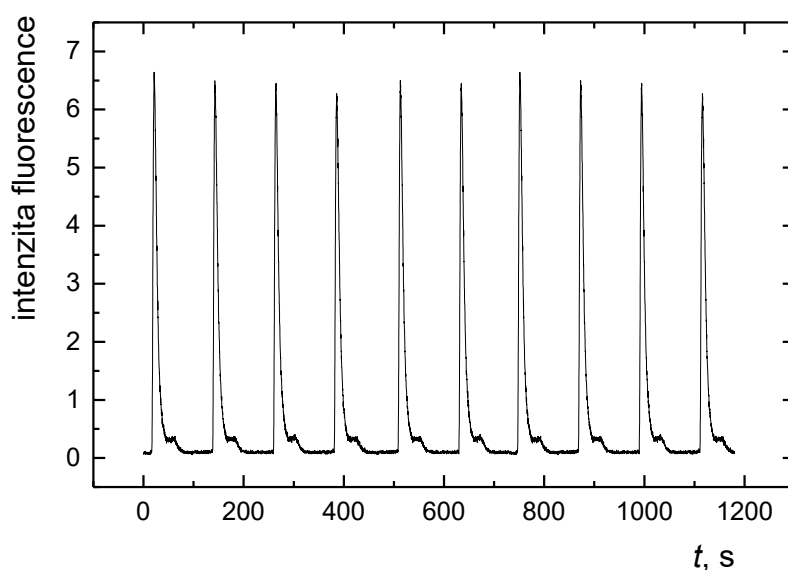
Z grafu je patrný podobný trend, který byl zaznamenán ve FIA uspořádání. Část křivky je lineární a to v rozmezí aktivit nadroparinu od 0,4 do 1,6 IU ml⁻¹, poté se ustálí. Tento jev byl již diskutován v kapitole 4.2.2. Statistické zhodnocení těchto výsledků je znázorněno v Tab. 4.8.

Tab. 4.8 Statistické zhodnocení výsledků uspořádání SIA s fluorimetrickou detekcí

rovnice lin. reg.	$s_{y/x}$	LOD, IU ml ⁻¹	LOQ, IU ml ⁻¹
$y = 6,3699x - 0,3759$	0,319	0,36	0,44

4.5.3. Opakovatelnost

Pro měření opakovatelnosti byl 10krát změřen vzorek nadroparinu o aktivitě 1,5 IU ml⁻¹ s methylenovou modří a to za podmínek, za kterých byla měřena kalibrační závislost nadroparinu (kapitola 4.5.2.). Záznam měření je pro ilustraci zobrazen na Obr. 4.15.



Obr. 4.15 Záznam měření opakovatelnosti pomocí SIA s fluorimetrickou detekcí. $aNAD = 1,5 \text{ IU ml}^{-1}$, $cMM = 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $v_p = 25 \mu\text{l s}^{-1}$ ($1,5 \text{ ml min}^{-1}$), $V_dNAD = 100 \mu\text{l}$, $U_{det} = 1000 \text{ V}$, $\lambda_{ex} = 621 \text{ nm}$.

Odchylka měření byla 2,01 %. Na záznamu je také vidět, že odezvy jsou stálé a základní linie je v rovině.

4.6.SIA uspořádání se spektrofotometrickou detekcí

4.6.1. Optimalizace parametrů

Vzhledem k tomu, že již v předchozích kapitolách byly optimalizovány parametry pro námi používanou SIA aparaturu (kapitola 4.5.1.) i pro spektrofotometrický detektor, nebyla optimalizace provedena znovu a byly použity hodnoty z předchozích měření.

4.6.2. Kalibrační závislost

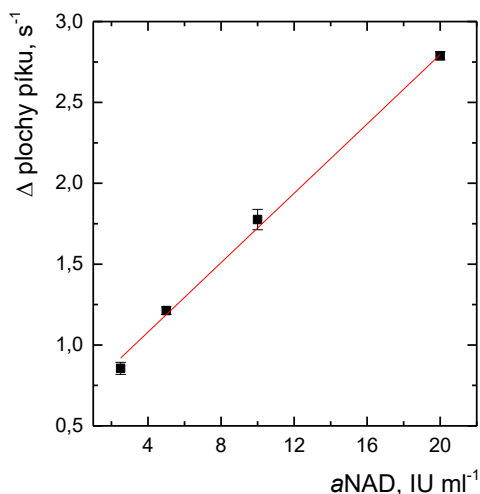
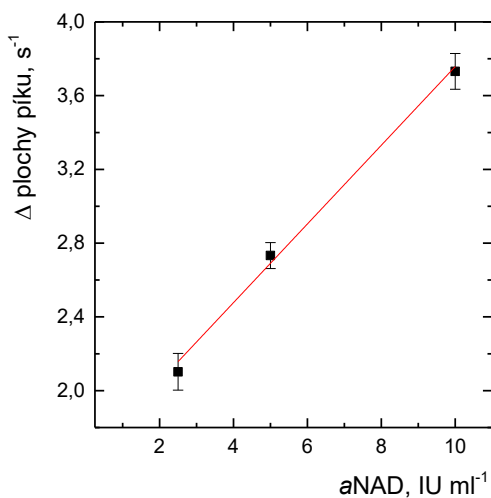
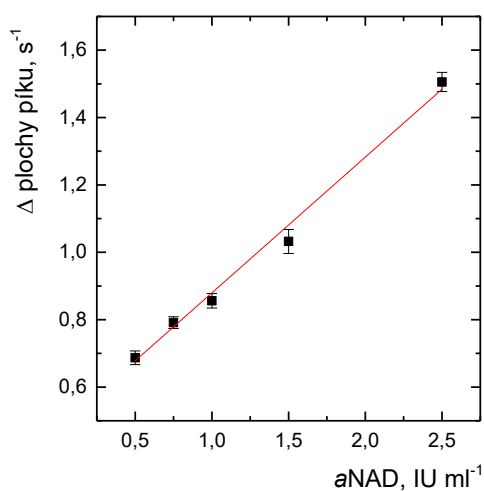
Byla změřena kalibrační závislost nadroparinu technikou SIA se spektrofotometrickou detekcí. Jako reagent byla použita methylenová modř, vzhledem k tomu, že se v předchozích měřeních projevila jako nejvhodnější. Všechna naměřená data jsou shrnuta v Tab. 4.9, na Obr. 4.16 jsou znázorněny lineární části kalibračních závislostí a porovnání statistických parametrů se nachází v Tab. 4.10.

Tab. 4.9 Kalibrační závislost nadroparinu při dávkování různého objemu methylenové modři a při různé koncentraci. Dávkovaný objem nadroparinu byl 100 μl .

$c_{\text{MM}} = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ $V_{\text{dMM}} = 100 \mu\text{l}$			$c_{\text{MM}} = 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ $V_{\text{dMM}} = 100 \mu\text{l}$			$c_{\text{MM}} = 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ $V_{\text{dMM}} = 50 \mu\text{l}$		
a_{NAD} , IU ml^{-1}	plocha píku, s^{-1}	relativní plocha píku	a_{NAD} , IU ml^{-1}	plocha píku, s^{-1}	relativní plocha píku	a_{NAD} , IU ml^{-1}	plocha píku, s^{-1}	relativní plocha píku
0	6,852	0,000	0	10,312	0,000	0	9,653	0,000
0,25	6,663	0,190	0,25	9,948	0,364	0,25	9,490	0,164
0,50	6,165	0,687	0,50	9,705	0,607	0,50	9,573	0,081
0,75	6,061	0,791	0,75	9,236	1,077	0,75	9,257	0,396
1,0	5,996	0,856	1,0	9,055	1,257	1,0	9,143	0,510
1,5	5,820	1,032	1,5	8,818	1,495	1,5	9,113	0,541
2,5	5,347	1,506	2,5	8,210	2,102	2,5	8,798	0,856
5,0	4,719	2,134	5,0	7,580	2,733	5,0	8,441	1,213
10	4,397	2,456	10	6,581	3,731	10	7,878	1,776
						20	6,865	2,788

Tab. 4.10 porovnání limitů detekce a limitů stanovitelnosti při dávkování různé koncentrace a různého objemu methylenové modři.

	$c_{MM} = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ $V_{dMM} = 100 \mu\text{l}$	$c_{MM} = 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ $V_{dMM} = 100 \mu\text{l}$	$c_{MM} = 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ $V_{dMM} = 50 \mu\text{l}$
rovnice lin. reg.	$y = 0,4061x + 0,4668$	$y = 0,2147x + 1,603$	$y = 0,1088x + 0,6382$
$S_{y/x}$	0,034	0,070	0,059
LOD, IU ml^{-1}	0,25	0,98	1,63
LOQ, IU ml^{-1}	0,83	3,26	5,44



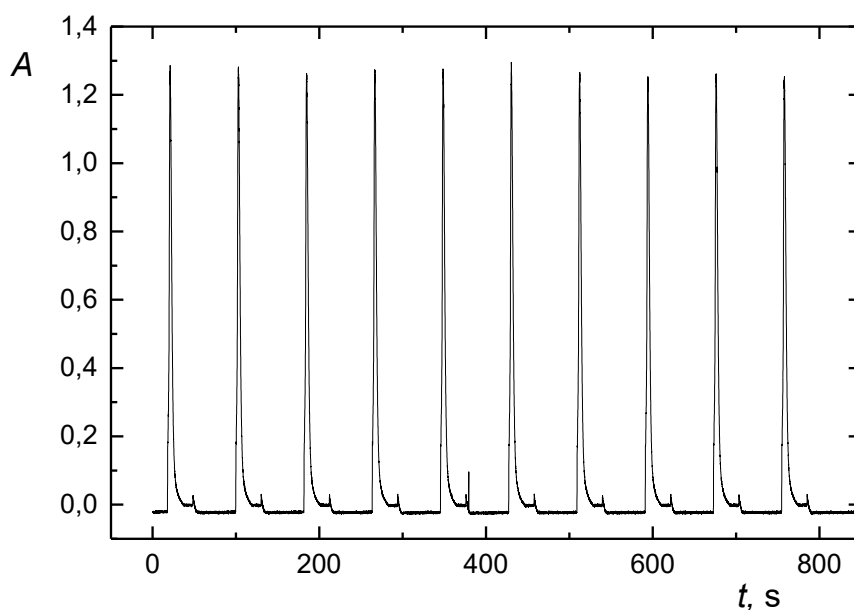
Obr. 4.16 porovnání lineárních oblastí kalibračních závislostí pro různé koncentrace methylenové modři a různě dávkované objemy. Podmínky měření: (a) $c_{MM} = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $V_{dMM} = 100 \mu\text{l}$; (b) $c_{MM} = 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $V_{dMM} = 100 \mu\text{l}$; (c) $c_{MM} = 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $V_{dMM} = 50 \mu\text{l}$

Během experimentů byly při SIA uspořádání se spektrofotometrickou detekcí vyzkoušeny dva způsoby dávkování barviva. Při dávkování většího objemu barviva o nižší koncentraci byla pozorována lineární část kalibrační závislosti v oblasti nižších aktivit nadroparinu. Tento způsob je tedy výhodný hlavně ke stanovení, kdy předpokládáme nízkou aktivitu nadroparinu ve vzorku. Lineární část takto získané kalibrační závislosti se pak pohybuje v rozmezí aktivit nadroparinu $0,5 - 2,5 \text{ IU ml}^{-1}$ a není tedy vhodná pro stanovení vyšších aktivit nadroparinu. Druhým způsobem pak bylo dávkování menšího objemu barviva o současně vyšší koncentraci. V tomto případě byla lineární část kalibrační závislosti posunuta k vyšším aktivitám nadroparinu a byla lineární ve větším rozsahu aktivit nadroparinu ($2,5 - 20 \text{ IU ml}^{-1}$). Výše uvedené závěry jsou ve shodě s následující představou. Z podstaty výpočtu absorbance (záporný logaritmus transmitance) vyplývá, že nízká aktivita interagujícího analytu (jehož přítomnost způsobí pokles absorpčního signálu čistého barviva úměrnou aktivitě tohoto analytu) bude lépe postřehnutelná (způsobí větší rozdíl absorbance) v prostředí barviva o nižší koncentraci.

4.6.3. Opakovatelnost měření

Stejně jako v předchozích experimentech i zde byla zjištěna opakovatelnost měření. Pro tento účel byl 10krát změřen vzorek nadroparinu o aktivitě $1,5 \text{ IU ml}^{-1}$ za podmínek určených jako optimálních pro stanovení nadroparinu technikou SIA se spektrofotometrickou detekcí. Záznam tohoto měření je na Obr. 4.17.

Odchylka měření byla 2,59 %. V porovnání s fluorimetrickou detekcí je tato hodnota nepatrně vyšší. Spektrofotometrická detekce je méně citlivá než fluorimetrická, pravděpodobně proto je odchylka měření větší.



Obr. 4.17 Záznam měření opakovatelnosti SIA se spektrofotometrickou detekcí.

Podmínky měření: $c_{MM} = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $a_{NAD} = 1,5 \text{ IU ml}^{-1}$; $V_{dMM} = 100 \text{ } \mu\text{l}$;

4.7. Srovnání výsledků

Výhodou statického upořádání jsou nízké ekonomické nároky. Jeho nevýhodou je ale nemožnost automatizace procesu a relativně vyšší spotřeba reakčních činidel a analytu při přípravě kalibračních roztoků. Toto uspořádání bylo tedy použito v této práci hlavně pro orientační měření, jako výběr barviva a zjištění vhodného rozsahu koncentrací barviva a aktivit nadroparinu.

FIA uspořádání se spektrofotometrickou i fluorimetrickou detekcí se zprvu zdála být vhodnou metodou pro stanovení nadroparinu. Její velkou nevýhodou však byla hlavně velká spotřeba reakčního činidla (barviva), což je nežádoucí, pokud by měl být proces zaveden pro rutinní analýzy, kdy je finanční náročnost a množství produkovaného odpadu velmi důležitým kritériem. Její další nevýhodou byl relativně velký šum základní linie, který ztěžoval vyhodnocení ploch píků, a to jak se spektrofotometrickou, tak i s fluorimetrickou detekcí. Přes všechny nevýhody však stanovení nadroparinu bylo možné.

SIA uspořádání se spektrofotometrickou i fluorimetrickou detekcí bylo vyhodnoceno jako vhodná varianta pro stanovení nadroparinu pomocí fenothiazinových barviv.

Spotřeba činidel byla minimální, opakovatelnost výsledků byla velmi dobrá. U této techniky navíc byla možnost dvojího způsobu dávkování tak, že byl posunut lineární rozsah k nižším nebo vyšším aktivitám nadroparinu, což u FIA uspořádání nebylo možné. Dle očekávání vykazovala reprodukovatelnější výsledky fluorimetrická detekce, která je citlivější.

Shrnutí charakteristik jednotlivých metod a detekcí se nachází v Tab. 4.11. Z tabulky je patrné, že dosažené charakteristiky jsou si navzájem velmi podobné. Z hlediska výše uvedených důvodů je však stanovení nadroparinu výhodnější pomocí techniky SIA.

Tab. 4.11 shrnutí statistických parametrů použitých technik průtokové analýzy se spektrofotometrickou a fluorimetrickou detekcí. Parametry měření LOD a LOQ byly použity ty, které byly vyhodnoceny jako optimální. SPF = spektrofotometrická detekce, FL = fluorimetrická detekce

charakteristika	FIA +SPF	FIA + FL	SIA + SPF	SIA +FL
Mez detekce (IU ml ⁻¹)	0,05	0,09	0,25	0,09
Mez stanovitelnosti (IU ml ⁻¹)	0,16	0,33	0,83	0,44
Opakovatelnost (%)	2,64	2,85	2,59	2,01
Lineární dynamický rozsah do(IU ml ⁻¹)	1,5	2,00	2,5	1,6

5. Závěr

Cílem této práce bylo vypracovat a porovnat stanovení nadroparinu pomocí technik průtokové analýzy. Konkrétně se jednalo o techniky průtokové injekční a sekvenční injekční analýzy (FIA a SIA) s dvěma různými způsoby detekce – spektrofotometrickou a fluorimetrickou. Stanovení bylo založeno na interakci nadroparinu s fenothiazinovými barvivy, majícími charakteristická absorpční i fluorescenční spektra.

Měření byla nejdříve provedena staticky na spektrofotometru a fluorimetru. Dále byly u každé techniky optimalizovány různé experimentální parametry. Důvodem optimalizace bylo zajištění takových podmínek, při kterých bude pokles analytického signálu nejzřetelnější a měření bude co nejvíce citlivé. Dále byla u všech technik za optimálních podmínek sestrojena kalibrační závislost nadroparinu ve vybraném rozsahu aktivit nadroparinu za účelem zjištění limitu detekce, limitu stanovitelnosti a lineárního dynamického rozsahu. Poté byl 10 krát změřen vzorek nadroparinu za účelem zjištění opakovatelnosti měření.

SIA se spektrofotometrickou i fluorimetrickou detekcí byla vyhodnocena jako vhodná metoda pro stanovení nadroparinu a to i jako možnost pro rutinní analýzy v analytické laboratoři pro účely kontroly kvality. Výhodou byla snadná automatizovatelnost a velký lineární dynamický rozsah, který bylo možné posunout k nižším nebo vyšším aktivitám nadroparinu podle dávkovaného objemu methylenové modři a především velmi nízká spotřeba všech reakčních složek.

Reference:

1. Fraxiparine, product monograph, GlaxoSmithKline Inc., 44 stran (2011)
2. Fraxiparine, souhrn údajů o přípravku, dostupné na www.sukl.cz, sp.zn. sukls150426/2015,
3. Barradell, L.B.; Buckley, M.: Nadroparin Calcium A Review of its Pharmacology and Clinical Applications in the Prevention and Treatment of Thromboembolic Disorders, *Drugs*, 44:5, 858 – 888 (1992)
4. National Cancer institute – nadroparin definition dostupné z URL <
<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug?cdrid=483128>>
[cit. 15.2.2017]
5. Jiao, Q.; Liu, Q.: Characterization of the interaction between methylene blue and glycosaminoglycans, *Spectrochimica Acta Part A*, 55, 1667–1673 (1999)
6. Pat. CN103149170 A Guang, Ch.; Huagan, Z.; Ping, Z.; Yuanyuan, W.; Yang, S.: Solution concentration of nadroparin calcium determined by phenanthroline-zinc sulfate ultraviolet spectroscopy (5.3.2017)
7. Collingnon, F.; Frydman, A.; Caplain, H.; Ozoux, M.L.; Leroux, Y.; Bouthier, J.; Thebault, J.J.: Comparison of the pharmacokinetic profiles of 3 low-molecular-weight-heparins - dalteparin, enoxaparin and nadroparinu – administered subcutaneously in healthy-volunteers (doses for prevention of thromboembolism), *Thrombosis and Haemostasis*, 73:4, 630 – 640 (1995)
8. Xu, X.; Li, D.; Chi, L.; Du, X.; Bai, X.; Chi, L.: Fragment profiling of low molecular weight heparins using reversed phase ion pair liquid chromatography-electrospray mass spectrometry, *Carbohydrate Research* 407 26 – 33 (2015)
9. Higashi, K.; Hosoyama, S.; Ohno, A.; Masuko, S.; Yang, B.; Sterner, E.; Wang, Z.; Linhardt, R.J.; Toida, T.: Photochemical Preparation of a Novel Low Molecular Weight Heparin, *Carbohydrate Polymers*, 67:2, 1737 – 1743 (2012)
10. Chlumský, J. et al.: Antikoagulační léčba, Praha, Grada Publishing (2005)
11. Sherwood, L.: Human physiology: From Cells to Systems 7. edition, Belmont, Brooks/Cole (2010)
12. Collingnon, F.; Frydman, A.; Caplain, H.; Ozoux, M.L.; Leroux, Y.; Bouthier, J.; Thebault, J.J.: Comparison of the pharmacokinetic profiles of 3 low-molecular-weight-heparins - dalteparin, enoxaparin and nadroparinu –

- administered subcutaneously in healthy-volunteers (doses for prevention of thromboembolism), *Thrombosis and Haemostasis*, 73:4, 630 – 640 (1995)
13. Forsh, D.A.; Gellman, H.; Deep Venous Thrombosis Prophylaxis in Orthopedic Surgery, dostupné z URL <<http://emedicine.medscape.com/article/1268573-overview>> [cit. 22.4.2017]
 14. Lai, S.; Coppola, B.: Use of enoxaparin in end-stage renal disease, *Kindney International*, 84:3, 433 – 436 (2013)
 15. Kuberan, B.; Lech, Z.M.; Beeler, D.L.; Wu, Z.L.; Rosenberg, R.: Enzymatic synthesis of antithrombin III – binding heparan sulfate pentasaccharide, *Nature Biotechnology*, 21, 1343 – 1346 (2003)
 16. Kiernan, J.A.: Classification and naming of dyes, stains and fluorochromes, *Biotechnic & Histochemistry*, 76:5-6, 261-278 (2001)
 17. Mitchell, S.C.: Phenothiazine – the parent molecule, *Current Drug Targets*, 7:9, 1181 – 1189 (2006)
 18. Jaszczyszyn, A.; Kazimierz, G.; Swiatek, P.; Malinka, M.; Cieslik-Boczula, K.; Petrus, J.; Czarnik-Matusiewicz, B.: Chemical structure of phenothiazines and their biological activity, *Pharmacological Reports*, 64, 16 – 23 (2012)
 19. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7108#section=Top>> [cit. 5.4.2017]
 20. Oud, P.S.; Zahniser, D.J.; Vooijs, G.P.; Raaymakers, M.C.T.; Vandewalle, R.T.: Thionine-Feulgen congo red – a new staining technique for automated cytology, *Acta Histochemica*, 24, 199 – 206 (1981)
 21. Snehalatha, M.; Joe, I.H.; Ravikumar, C.; Jayakumar, V.S.: Azure A chloride: computational and spectroscopic study, *Journal of Raman spectroscopy*, 40, 176 – 182 (2009)
 22. Spicer, S.S.: Histochemical Differentiation of Mammalian Mucopolysaccharides, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 106, 379 – 388 (1963)
 23. Liu, T.; Luo, Y.; Kong, L.; Zhu, J.; Wang, W.; Tan, L.: Non-enzymatic detection of glucose using poly(azureA)-nickel modified glassy carbon electrode, *Talanta*, 156:157, 134–140 (2016)

24. Liu, T.; Luo, Y.; Kong, L.; Zhu, J.; Wang, W.; Tan, L.: Voltammetric detection of Cu²⁺ using poly(azure A) modified glassy carbon electrode based on mimic peroxidase behavior of copper, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 235, 568 – 574 (2016)
25. Bezrukov, A.V.: Romanowsky staining, the Romanowsky effect and thoughts on the question of scientific priority, *Biotechnic & Histochemistry*, 92:1, 29-35 (2017)
26. Zi, Y.Q.; Ding, Y.B.; Zhang, D.H.; Wang, Q.: Interaction of ribonucleic acid with azure A and determination of ribonucleic acid by spectrophotometry, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 33:12, 1757 – 1760 (2005)
27. Mathew, M.; Narayana, B.: An easy spectrophotometric determination of selenium using azure B as a chromogenic reagent, *Indian Journal of Chemical Technology*, 13:5, 455 – 458 (2006)
28. Huang, Y.G.; Wang, H.Y.; Hu, X.Y.: Detection of glucose at glassy carbon electrode modified by poly(azure B)/copper nanocomposite films, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 34:8, 1119 – 1121 (2006)
29. Panizza, M.; Barbucci, A.; Ricotti, R.; Cerisola, G.: Electrochemical degradation of methylene blue, *Separation and Purification Technology*, 54:3, 382–387 (2007)
30. Jakubowska, M.; Adamus, J.; Gębicki, J.; Marcinek, A.; Sikora, A.: Pulse radiolysis and spectrophotometric studies on the binding of organic cations with heparin, *Radiation physics and chemistry*, 99, 6 – 11 (2014)
31. Liu, Q.; Jiao, Q.C.; Liu, Z.L.; Chen, H.: The interaction of polysaccharides with a spectroscopic probe: The anion effect on the binding site of heparin, *Spectroscopy Letters*, 34:1, 25 – 34 (2001)
32. Luo, H.Q.; Liu, S.P.; Liu, Z.F.; Liu, Q.; Li, N.B.: Resonance Rayleigh scattering spectra for studying the interaction of heparin with some basic phenothiazine dyes and their analytical applications, *Analytica Chimica Acta*, 449, 261–270 (2001)
33. Bromfield, S.M.; Wilde, E.; Smith, D.K.: Heparin sensing and binding – taking supramolecular chemistry towards clinical applications, *Chemical Society Reviews*, 42, 9184 – 9195 (2013)

34. Ruzicka, J.; Hansen, E.H.: Flow Injection analyses .1. new concept of fast continuous-flow analysis, *Analytica Chimica Acta*, 78:1, 145 – 157 (1975)
35. Abate, G.; Santos, L.B.O.; Colombo, S.M.; Masini, J.C.: Sequential Injection Analysis as a Tool for On-Line Monitoring the Sorption of Fulvic Acid onto Modified Vermiculite, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17:3, 491 – 496 (2006)
36. <www.flowinjectiontutorial.com> [cit. 22.4.2017]
37. Murillo Pulgarin, J.A.; Garcia Bermejo, L.F.; Carrasquero Duran, A: Determination of Antioxidant Activity of Hibiscus Flowers by Flow Injection Analysis with Chemiluminescence Detection, *Analytical Letters*, 50:1, 186 – 196 (2017)
38. Nalewajko-Sieliwoniuk, E.; Malejko, J.; Świczowska, M.; Kowalewska, A.: A study on the selection of chemiluminescence system for the flow injection determination of the total polyphenol index of plant-derived foods, *Food Chemistry*, 176, 175 – 183 (2015)
39. Hansen, E.H.; Winther, S.K.; Gundstrup, M.: Enzymatic assay of oxalate in urine by flow-injection analysis immobilized oxalate oxidase and chemiluminescence detection, *Analytical Letters*, 27:7, 1239 – 1253 (1994)
40. Prasertboonyai, K.; Liawraungrath, B.; Pojanakaroon, T.; Liawraungrath, S.: Mercury(II) determination in commercial cosmetics and local Thai traditional medicines by flow injection spectrophotometry, *International Journal of Cosmetic Science*, 38, 68 – 76 (2016)
41. Wnag, S.; Kunning, L.; Chen, N.; Yuan, D.; Ma, J.: Automated determination of nitrate plus nitrite in aqueous samples with flow injection analysis using vanadium (III) chloride as reductant, *Talanta*, 146, 744 – 748 (2016)
42. <www.ideiam.com/labtools/products/fia/> [cit. 22.4.2017]
43. Oms, M.T.; Cerdà, A.; Cerdà, V.: Sequential injection analysis of nitrites and nitrates, *Analytica Chimica Acta*, 315, 312–330 (1995)
44. Rattanakit, P.; Prasertboonyai, K.; Liawruanrath, S.: Development of sequential injection spectrophotometric method for determination of mercury (II) using pyrogallol red, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 96:15, 1415-1429 (2016)

45. Klouda, P.: *Moderní analytické metod 2.vyd.*, Ostrava, Pavel Klouda (2003)
46. Solich, P.; Polášek, M.; Klimundová, J.; Ruzicka, J.: Sequential injection technique applied to pharmaceutical analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, 22:7, 116 – 126 (2003)
47. Ruzicka, J.: Lab-on valve: Universal microflow analyzer based on sequential and bead injection, *Analyst*, 125:6, 1053–1060 (2000)
48. Economou, A.: Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line samplehandling and pre-treatment, *Trends in Analytical Chemistry*, 24:5, 416 - 425 (2005)
49. Wang, J.; Hansen, E.H.: Sequential injection lab-on-valve: the third generation of flow injection analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, 22:4 225 – 231 (2003)
50. Ruzicka, J.; Scampavia, L.: From Flow Injection to Bead Injection, *Analytical Chemistry News & Features*, 257 – 263 (1999)
51. Quintana, J.B.; Miró, M.; Estela, J.M.; Cerdá, V.: Automated On-Line Renewable Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography Exploiting Multisyringe Flow Injection-Bead Injection Lab-on-Valve Analysis, *Analytical Chemistry*, 78:8, 2832 - 2840 (2006)
52. Satinsky, D; Huclova, J.; Solich, P.; Karlicek, R.: Reversed-phase porous silica rods, an alternative approach to high-performance liquid chromatographic separation using the sequential injection chromatography technique, *Journal of Chromatography A*, 1015:1-2; 239 – 244 (2003)