

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**FIA METODY PRO STANOVENÍ
GLYKOSAMINGLYKANŮ**

FIA Methods for Glycosaminoglycans Determination

Bakalářská práce

studijního oboru Klinická a toxikologická analýza

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Klíčová slova: heparin, chondroitin sulfát, safranin, injekční průtoková analýza,

Předmětová hesla: analytická chemie, glykosaminglykany

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele RNDr. Karla Nesměráka, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 28. května 2009.

Poděkování

Ráda bych na tomto místě vyjádřila poděkování mému školiteli RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D., za jeho cenné rady, připomínky, pomoc a čas, který mi při měření a psaní bakalářské práce věnoval. Dále bych ráda poděkovala své rodině a přátelům, kteří mě podporovali za dosavadní dobu mého studia.

Obsah

	Seznam zkratk a symbolů	5
1	Cíl práce	6
2	Přehled a rozbor literatury	7
2.1	Glykosaminglykany	7
2.1.1	Heparin	8
2.1.2	Chondroitin sulfát	9
2.2	Metody stanovení glykosaminglykanů	10
2.3	Safranin	11
2.4	Průtoková injekční analýza	12
3	Experimentální část	15
3.1	Použité chemikálie	15
3.2	Použité přístroje	15
3.2.1	Molekulová absorpční spektrometrie	15
3.2.2	Průtoková injekční analýza	16
3.3	Zpracování naměřených dat	16
4	Výsledky a diskuse	18
4.1	Statické měření	18
4.1.1	Heparin	18
4.1.2	Chondroitin sulfát <i>c</i>	20
4.2	Dynamické měření	23
4.2.1	Optimalizace FIA stanovení	23
4.2.2	Kalibrační přímka	26
5	Závěr	29
	Literatura	30

Seznam zkratek a symbolů

<i>A</i>	absorbance	
<i>c</i>	molární koncentrace	[mol dm ⁻³]
CS	chondroitin sulfát	
CSA	chondroitin sulfát <i>a</i>	
CSC	chondroitin sulfát <i>c</i>	
<i>F</i>	průtoková rychlost nosného proudu	[ml min ⁻¹]
FIA	průtoková injekční analýza (z angl. flow injection analysis)	
GAG	glykosaminglykany	
<i>h</i>	výška FIA píku	[s]
HEP	heparin	
IU	aktivita deklarovaného množství mezinárodního standardu (z angl. international units)	
<i>M</i>	molární hmotnost	[g mol ⁻¹]
<i>S</i> _{max}	maximální vzorkovací frekvence	[h ⁻¹]
SF	safranin	
<i>t</i>	čas	[s]
<i>t</i> _a	čas potřebný k dosažení přední hrany toku k detektoru	[s]
Δt	čas vzorku strávený v detektoru (šířka FIA píku při základně)	[s]
<i>t'</i>	časový rozdíl maximálního signálu a přední hrany toku	[s]
<i>T</i>	čas potřebný k dosažení maximálního signálu	[s]
<i>T'</i>	čas od maximálního signálu po konec detekce	[s]
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast spektra	
<i>V</i>	objem dávkovaného vzorku	[μ l]
<i>w</i> _i	váhový faktor	
<i>w</i>	šířka píku	[s]
λ	vlnová délka	[nm]

1 Cíl práce

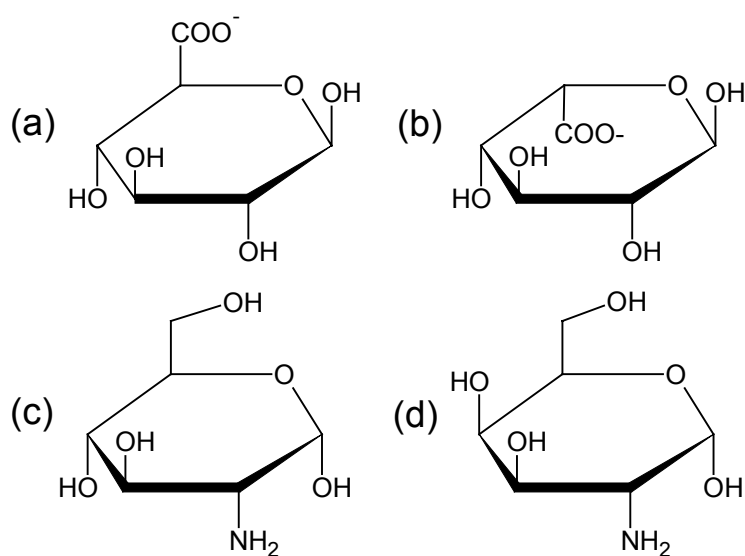
Cílem této bakalářské práce je navrhnout a optimalizovat metodu průtokové injekční analýzy se spektrofotometrickou detekcí pro stanovení glykosaminglykanů. Jelikož tyto látky spektrofotometricky neposkytují potřebnou odezvu, využívá se v této práci jejich interakce s barvivem safraninem, který s nimi vytváří barevné iontové komplexy, které lze poté snadno detekovat.

2 Přehled a rozbor literatury

2.1 Glykosaminglykany

Glykosaminglykany (GAG), známé také jako mukopolysacharidy, jsou z hlediska struktury negativně nabitě, lineární polysacharidy, tvořené opakujícími se disacharidovými jednotkami o molekulové hmotnosti 10 000 až 100 000 g mol⁻¹. Přítomný záporný náboj v molekulách zprostředkovávají navázané karboxylové a sulfátové skupiny [1].

Glykosaminglykany se liší podle typu opakující se jednotky hexuronové kyseliny (D-glukuronová nebo L-iduronová kyselina) a aminocukru (D-galaktosamin nebo D-glukosamin), jejichž struktury jsou zobrazené na obr. 2.1 a dále pak geometrií navázání glykosidické vazby mezi těmito jednotkami (α , β) [1].



Obr. 2.1 Stavební jednotky glykosaminglykanů

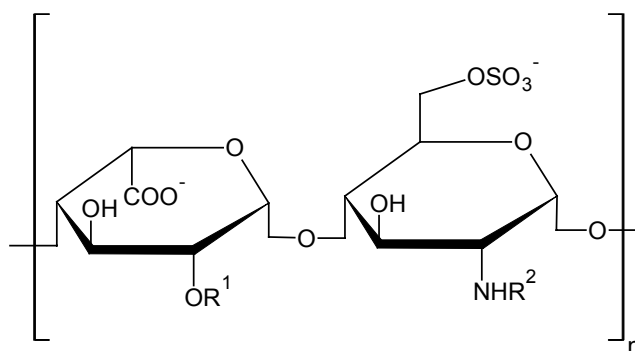
(a) D-glukuronová kyselina, (b) L-iduronová kyselina,

(c) D-glukosamin, (d) D-galaktosamin

Glykosaminglykany jsou heterogenní polydispersní skupinou látek, protože nejsou syntetizované jako homologické kopie [2]. Díky vazbě na proteiny jsou přítomny v extracelulárním prostoru všech živých buněk, kde se účastní mnoha biologických procesů. Na základě přítomnosti síranového zbytku je lze klasifikovat do dvou základních skupin: (1) na non-síranový typ, kam patří hyaluronová kyselina, a (2) síranový typ, kam patří chondroitin sulfát, dermatan sulfát, keratan sulfát, heparin a heparan sulfát [1].

2.1.1 Heparin

Heparin (HEP) patří z hlediska struktury k nejsložitějším zástupcům GAG [3]. Jeho molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 6 000 až 20 000 g mol⁻¹ [4]. V molekule heparinu dochází ke střídání hexuronových kyselin vázaných α (1→4) glykosidickou vazbou s D-glukosaminem [3]. Obvykle je tvořen 90 % L-iduronové kyseliny a 10 % D-glukuronové kyseliny [1]. Struktura heparinu (obr. 2.2) není doposud zcela objasněna, neboť přítomné disacharidové jednotky brání kompletní strukturní analýze. Složitá struktura molekuly je způsobena proměnlivostí postranních navázaných karboxylových, sulfátových a acetylových skupin [3]. Oproti jiným biomolekulám se odlišuje výrazně největším záporným nábojem [1].



Obr. 2.2 Struktura heparinu ($R^1 = -H, -OSO_3^-$, $R^2 = -SO_3^-, -COCH_3$)

Na rozdíl od ostatních GAG se heparin vyskytuje v granulích žírných buněk, kde je syntetizován jako heparin proteoglykan, který se skládá z proteinového jádra serglycinu, na které jsou kovalentně připojeny další polysacharidové řetězce heparinu [3].

Heparin se od roku 1935 (objeven v roce 1916) používá pro své klinicky významné vlastnosti a po inzulínu patří k nejpoužívanějším přírodním léčebným prostředkům. Nejvíce známý je pro svou antikoagulační aktivitu, kromě té se však účastní řady dalších

biologických procesů, které vyplývají z jeho interakcí s proteiny [3]. Jedním z nejvíce studovaných vazeb heparinu s proteiny je pentasacharidový řetězec odpovědný za navázání antithrombinu III s následným zamezením koagulace [2]. Má také mírný antihistaminický účinek [5], dále se používá na léčbu trombózy, embolie a zánětu žil [1].

Heparin se získává výhradně izolací ze zvířecích (obvykle hovězích) jater, plic a střev, kde je jeho největší zastoupení. Podává se výhradně parenterálně, neboť při perorálním použití by docházelo k jeho rozkladu v trávicím traktu a tím ke ztrátám jeho účinku [4]. Největšího účinku se dosáhne intravenosním podáním [5]. Při dávkování heparinu se častěji používá vyjadřování v mezinárodních jednotkách (IU) jako aktivita deklarovaného množství mezinárodního standardu [6]. Heparin neprostupuje placentou a nevyučuje se do mateřského mléka. Jeho účinek je dokončen biotransformací v játrech a exkrecí v ledvinách [5].

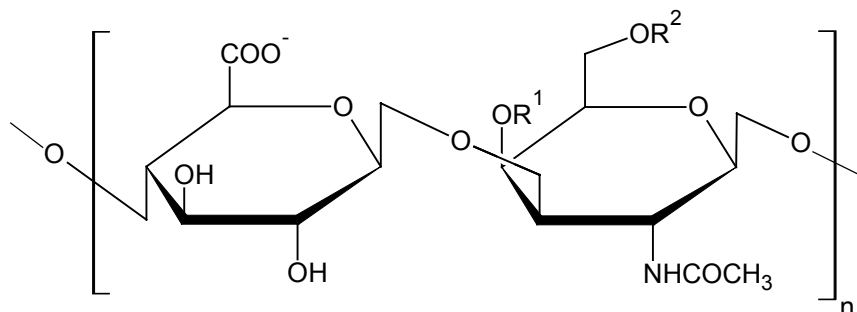
Antikoagulační schopnost heparinu je závislá na přítomnosti antithrombinu III, který ireverzibilně inhibuje aktivitu trombinu a dalších koagulačních faktorů. V podstatě zrychluje a podporuje funkci antithrombinu III, snižuje adhezivitu destiček k endoteliálním buňkám a tím snižuje vyplavování destičkového růstového faktoru. Mezi nežádoucí účinky patří krvácení do orgánů, přecitlivělost a při dlouhodobém používání hrozí osteoporosa [5].

Kromě vysokomolekulárního heparinu existuje též nízkomolekulární, který je obecně výhodnější pro lepší antikoagulační vlastnosti a menší množství nežádoucích účinků. Mechanismus účinku nastává v časně fázi srážení krve, podává se subkutánně, nejčastěji do břicha [5].

2.1.2 Chondroitin sulfát

Z hlediska struktury představuje chondroitin sulfát (CS) lineární řetězec tvořený opakujícími se disacharidovými jednotky D-glukuronové kyseliny s N-acetyl-D-galaktosaminem, které jsou střídavě spojeny vazbou $\beta(1\rightarrow3)$ a $\beta(1\rightarrow4)$. Jedná se tedy o mnohem jednodušší strukturu než u heparinu. Jeho molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 10 000 až 60 000 g mol⁻¹ [7].

Chondroitin sulfát (obr. 2.3) lze rozdělit podle polohy navázané sulfátové skupiny v N-acetyl-D-galaktosaminu na chondroitin-4-sulfát, nazývaný též chondroitin sulfát *a* (CSA) a na chondroitin-6-sulfát, nazývaný též chondroitin sulfát *c* (CSC) [7, 8].



Obr. 2.3 Struktura chondroitin sulfátu *a* ($R^1 = -\text{SO}_3^-$, $R^2 = -\text{H}$)
a chondroitin sulfátu *c* ($R^1 = -\text{H}$, $R^2 = -\text{SO}_3^-$)

Chondroitin sulfát se vyskytuje u všech savců jako hlavní součást chrupavek, dále v pojivové tkáni a ve stěnách cév [7, 8]. Významná je jeho vazba na bílkoviny podobně jako u heparinu [7]. Z vlastností CS vyplývá jeho využití jako prevence proti osteoartróze a arteroskleróze [8].

2.2 Metody stanovení glykosaminglykanů

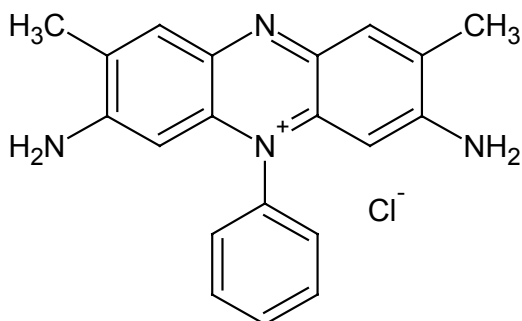
Heparin se nejčastěji stanovuje biologickými metodami *in vitro*, které jsou založené na schopnosti zpomalení precipitace srážení ovčí plazmy se srovnáním se standardem [6]. Mezi hlavní techniky stanovení GAG patří spektrofotometrie, chromatografie a elektroforetické dělení látek [6, 8]. Spektrofotometrické stanovení heparinu je založeno na interakci heparinového anionu s kationtovým barvivem, což se projeví zabarvením roztoku [6]. Spektrofotometrické techniky jsou mnohem jednodušší, levnější a často i citlivější na rozdíl od ostatních metod [6, 8].

Z elektroforetických metod je vhodnou technikou analýzy GAG kapilární elektroforéza, kde je přední výhodou silný aniontový charakter těchto molekul, zejména heparinu a minimální požadavky na vzorek (10–20 pg). Zlepšení detekční citlivosti a selektivity lze provést kombinací kapilární elektroforézy s laserem-indukovanou fluorescencí. Pro získání potřebné informace o struktuře je vhodné spojení s hmotnostní spektrometrií nebo s nukleární magnetickou rezonancí [2].

Kromě výše uvedených technik bylo navrženo stanovení pomocí průtokové injekční techniky se spektrometrickou detekcí pro heparin [6] a pro chondroitin sulfát [8] užitím thiazinových barviv.

2.3 Safranin

Safranin (SF) je krystalická látka s charakteristicky nazelenalým leskem snadno rozpustná ve vodě za vzniku sytě červeného zabarvení. Patří do skupiny azinových barviv, odvozených od N-fenylfenazonia [9]. Systematicky se jedná o 3,7-diamino-2,8-dimethyl-5-fenylfenazinium chlorid (CASN 477-73-6) a jeho struktura je zobrazena na obr. 2.5.



Obr. 2.5 Struktura safraninu

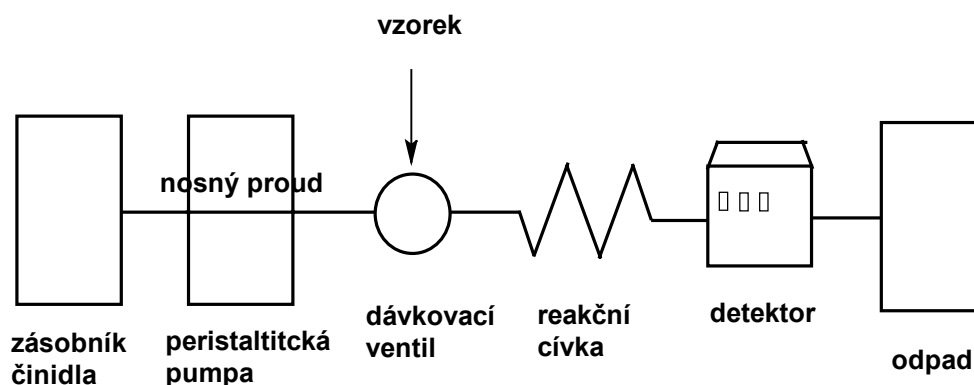
Safranin se v histologii a cytologii používá jako kontrastní barvivo pro barvení všech buněčných jader, v mikrobiologii má význam v Gramově barvení bakterií [10] a v analytické chemii jako indikátor v redoxních titracích [11].

2.4 Průtoková injekční analýza

Průtoková injekční analýza (FIA) byla poprvé použita roku 1975 jako vysoce účinná technika vhodná pro automatizované analýzy vzorků. Přinesla rychlou sekvenční analýzu, neomezený počet vzorků s nízkou spotřebou (řádově v μl), miniaturizaci, automatizaci analýzy, nižší ekonomické náklady, nebývalé úspory času a tím i snížení produkce odpadu. FIA začala být používána v celém rozmezí spektroskopických a elektrochemických metod, ať už v UV-VIS či atomové absorpční spektroskopii nebo ve spektroskopii s indukčně vázanou plazmou. V posledních letech se FIA vyvinula do metody sekvenčního nebo

perličkového vstřikování. Tyto nové metody nedávno umožnily nové přístupy ke zvýšení imunochemických stanovení, stopových analýz drog a studií v buněčné biologii [12, 13].

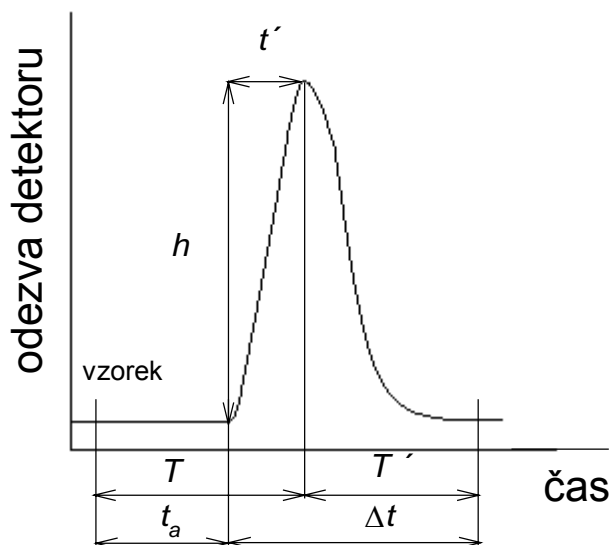
Průtoková injekční analýza představuje skupinu průtokových metod, které jsou založeny na pravidelném vstřikování kapalného vzorku do nosného proudu činidla. Na obr. 2.3 je znázorněno nejjednodušší schéma FIA aparatury, která se skládá z jednoho kanálu s jedním činidlem. Toto činidlo je uloženo v zásobníku, ze kterého je poháněno za konstantního průtoku čerpacími hadičkami pomocí peristaltické pumpy. Vzorek nadávkovaný do nosného proudu se s tímto činidlem smíchá a v důsledku nepřetržitého toku vytváří zóny, které pokračují na detektor, kde dochází ke vzniku přechodného signálu. Tvar tohoto signálu závisí na fyzikálních a chemických procesech, které probíhají mezi dobou nástřiku a dobou detekce [12].



Obr. 2.3 Schéma základního zapojení průtokové injekční analýzy

Vzorek nadávkovaný do proudu činidla vykazuje charakteristický obdélníkový profil toku se šířkou w . V reakční zóně, ve které dochází k míšení vzorku s činidlem, se profil šířky toku zvyšuje v důsledku disperse. Primárním procesem disperse v prvních 100 ms po nadávkování vzorku je konvence vzorku způsobená laminárním prouděním toku činidla, při kterém je lineární rychlost vzorku na stěnách trubice nulová, zatímco ve středu je dvakrát větší. V důsledku konvence má šířka toku parabolický profil. Asi po 25 s po nástřiku výrazně přispívá k dispersi jedině difúze v důsledku koncentračního gradientu mezi vzorkem a proudem činidla. Difúze pomáhá udržovat neporušenost profilu toku vzorku a tím předchází rozptýlení vzorků do proudu činidla. Difúze může probíhat

rovnoběžně (axiálně), většího významu ale nabývá kolmá (radiální) difúze na tok činidla, při které lineární rychlost vzorku ve středu trubek klesá a na okrajích se zvyšuje. Přibližně mezi 3 až 20 sekundami od nadávkování vzorku se disperse účastní oba dva zmíněné procesy. Tato doba je typickým časovým měřítkem pro vlastní analýzu [13].



Obr. 2.4 Záznam FIA píku a jeho charakteristika: t_a čas potřebný k dosažení přední hrany toku k detektoru, Δt čas vzorku strávený v detektoru (šířka FIA píku při základně), t' časový rozdíl maximálního signálu a přední hrany toku, T čas potřebný k dosažení maximálního signálu, T' čas od maximálního signálu po konec detekce, h výška FIA píku.

Při grafickém znázornění průběhu měření FIA se vynáší závislost velikosti detekovaného signálu na čase, jejíž průběh je zobrazen na obr. 2.4 a nazývá se FIA křivka neboli fiagram. Fiagram lze charakterizovat pomocí několika následujících parametrů. Parametry t_a a T popisují čas potřebný k pohybu vzorku od nástřiku k detektoru. Čas, t_a , určuje časový interval od nadávkování vzorku po dobu, kdy dorazí hrana profilu toku k detektoru a T , je čas potřebný k dosažení maximálního signálu na detektoru. Jejich rozdílem dostaneme čas, t' , jehož hodnota je nulová pouze tehdy, pokud je primárním prostředkem disperse konvekce a zvyšuje se s rostoucím příspěvkem difúze. Dalšími parametry popisují čas jsou Δt , který popisuje uplynulý čas mezi dobou, kdy dorazí hrana profilu toku k detektoru a po ukončení toku vzorku detektorem a T' je uplynulý čas mezi maximálním signálem a jeho návratem do výchozí hodnoty. Závěrem je fiagram charakterizován výškou píku, h , která odpovídá rozdílu mezi maximálním a výchozím signálem a jeho hodnota souvisí s kvantitou, kdy závisí přímo nebo nepřímo na

koncentraci analytu. Nejdůležitějšími parametry jsou tedy výška píku, která určuje citlivost metody a čas návratu, který určuje frekvenci, se kterou lze vzorky dávkovat. Tyto parametry jsou ovlivněny dispersí vzorku a dále fyzikálními a chemickými vlastnostmi toku vstřikovacího systému. Z fyzikálních parametrů sem patří objem vstřikovaného vzorku, průtok, délka, průměr, geometrie míchání i reakční zóny [13].

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

Jako první analyt byla použita sodná sůl heparinu, CAS 9041-084. Jako zdroj byl použit injekční roztok Heparin Forte Léčiva (Zentiva ČR) s aktivitou 25 000 IU heparinu v 1 ml (při deklarované aktivitě 150 IU mg⁻¹ tomu odpovídá koncentrace heparinu 167 mg ml⁻¹). Z tohoto injekčního roztoku byl vhodným naředěním deionizovanou vodou připraven zásobní roztok heparinu o koncentraci 5,0×10⁻⁴ mol dm⁻³.

Další studovanou látkou byl chondroitin sulfát *c* (Sigma-Aldrich, Německo), CAS 12678-07-8. Rozpuštěním odváženého množství CSC v deionizované vodě byl připraven zásobní roztok o koncentraci 1,0×10⁻⁴ mol dm⁻³.

Jako barvivo byl použit safranin O (Grübel, Německo), *M* = 350,84 g mol⁻¹. Rozpuštěním odváženého množství safraninu O v deionizované vodě byl připraven zásobní roztok o koncentraci 1,0×10⁻⁴ mol dm⁻³.

Všechny připravené roztoky byly doplněny deionizovanou vodou, která byla připravená na zařízení MiliQ (Milipore) s následnou úpravou pH. Pro měření pH byl použit pH-metr 3510 (Jenway) s kombinovanou skleněnou elektrodou. Výsledné pH deionizované vody bylo upraveno na hodnotou pH = 6,0 pomocí roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 2,0 mol dm⁻³.

3.2 Použité přístroje

3.2.1 Molekulová absorpční spektrometrie

K měření absorpčních spekter sloužil diode-array spektrofotometr HP 8453 (Hewlett Packard), spektra byla měřena ve viditelné oblasti spektra v rozsahu vlnových délek 400–700 nm v křemenné kyvetě o tloušťce absorbující vrstvy 1 cm. Naměřená spektra byla zpracována řídicím softwarem UV-Visible Chemstation A.09 (Hewlett Packard).

3.2.2 Průtoková injekční analýza

Měření v módu průtokové injekční analýzy bylo realizováno v jednoduché aparatuře, jejíž schéma je na obr. 2.3. Nosným proudem byl vodný roztok safraninu O o koncentraci $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, s pH roztoku upraveném na hodnotu 6,0. K jeho čerpání byla použita peristaltická pumpa Masterflex (Cole-Palmer) s čerpacími hadičkami Tygon R-3603 (Cole-Palmer). Do aparatury byla zařazována reakční cívka sestavená navinutím hadičky Tygon R-3606 o délce 40 cm na trubici průměru 5 mm. Vzorokly byly vstříkovány pomocí šesticestného dávkovacího ventilu V-450 (Upchurch Scientific) s dávkovacími smyčkami o objemu 30, 50 a 100 μl . Detekce byla realizována na spektrofotometru HP 8453 v kinetickém programu při vlnové délce 520 nm v křemenné průtokové kyvetě (Hellma) o vnitřním objemu 130 μl a optické dráze 1 cm.

3.3 Zpracování naměřených dat

Naměřená data byla vyhodnocena v softwarových programech Origin 7.5 (Microcal), ve kterém byly odečteny hodnoty výšek FIA píků a jako výsledky byly brány jejich mediány a dále Microsoft Excel XP (Microsoft), ve kterém byly prováděny výpočty faktorového pokusu. Tyto data byla zpracována obvyklými statistickými postupy [14].

Pro stanovení stechiometrického poměru glykosaminglykan:safranin byla použita metoda kontinuálních variací [15, 16]. Za předpokladu, že safranin SF a příslušný glykosaminglykan GAG spolu vytváří komplex podle vztahu



byla proměřována závislost absorbance při vlnové délce charakteristické pro komplex GAG_aSF_b série roztoků safraninu (o koncentraci c_{SF}) a příslušného glykosaminglykanu (o koncentraci c_{GAG}) s celkovou stálou koncentrací c_0 ($c_0 = c_{\text{SF}} + c_{\text{GAG}}$). Poměr obou složek byl však proměnný, takže se postupně měnily molární zlomky x_{SF} a x_{GAG} od 0 do 1. Jelikož absorbovalo samotné použité barvivo (safranin), byla do Jobovy funkce $A = f(x_{\text{GAG}})$ vynášena korigovaná absorbance, tedy naměřená absorbancí komplexu SF-GAG, od které

byla odečtena hodnota absorbance samotného safraninu při dané x_{SF} . Molární zlomek $x_{GAG, \max}$, v němž Jobova funkce procházela maximem, udával poměr stechiometrických koeficientů a i b podle vztahu

$$x_{GAG, \max} = \frac{b}{a + b} \quad (3.2)$$

Pro stanovení maximální vzorkovací frekvence při FIA stanovení byl použit vztah

$$S_{\max} = \frac{3600}{\Delta t} \quad (3.3)$$

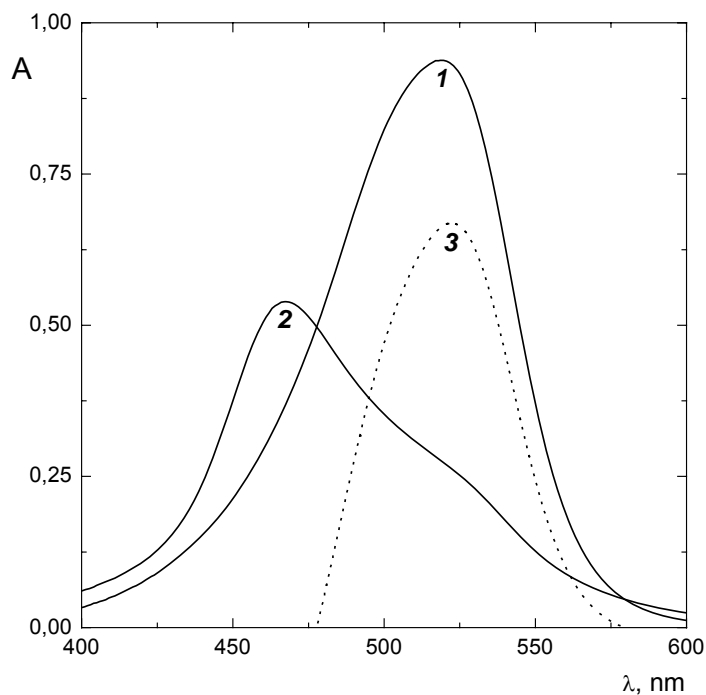
kde $S_{\max} [h^{-1}]$ je maximální počet vzorků stanovitelných za hodinu, $\Delta t [s]$ je šířka FIA píku při základně pro nejvyšší koncentraci vzorku z kalibrační přímky.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Statické měření

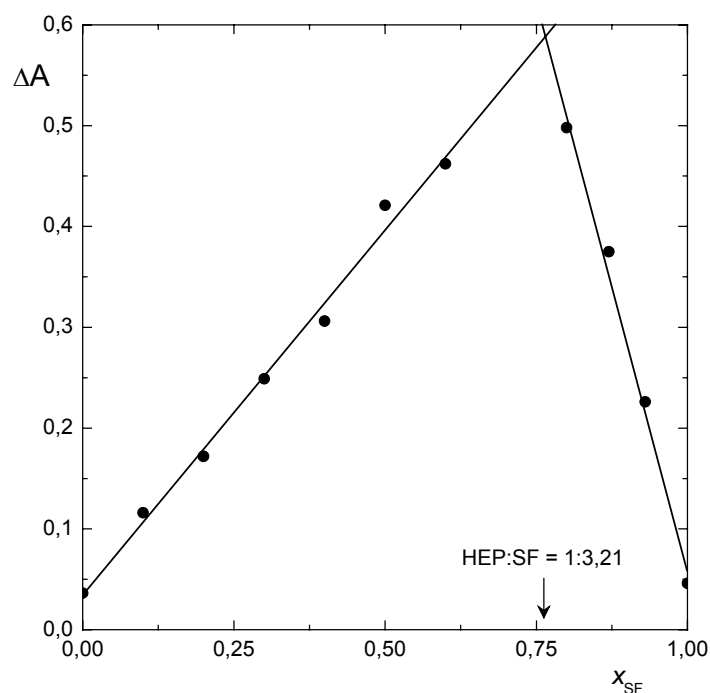
4.1.1 Heparin

Na obr. 4.1 je zobrazeno absorpční spektrum vodného roztoku safraninu o koncentraci $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, které vykazuje absorpční maximum při 519 nm. V přítomnosti heparinu o koncentraci $9,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ dochází k poklesu intenzity absorpčního maxima. Odečtením těchto absorpčních křivek byla získána diferenční křivka, která dosahuje absorpčního maxima při 520 nm.



Obr. 4.1 Absorpční spektra vodných roztoků (1) safraninu ($c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), (2) safraninu ($c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) v přítomnosti heparinu ($c = 9,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) a (3) diferenční křivka spekter (1) a (2). Měřeno v 1 cm kyvetě.

K určení stechiometrického poměru mezi heparinem a barvivem safraninem byla použita metoda kontinuálních variací při celkové koncentraci složek $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Pomocí grafického vyhodnocení Jobovy funkce (obr. 4.2) byl poměr reagujících složek stanoven HEP:SF = 1:3,21.

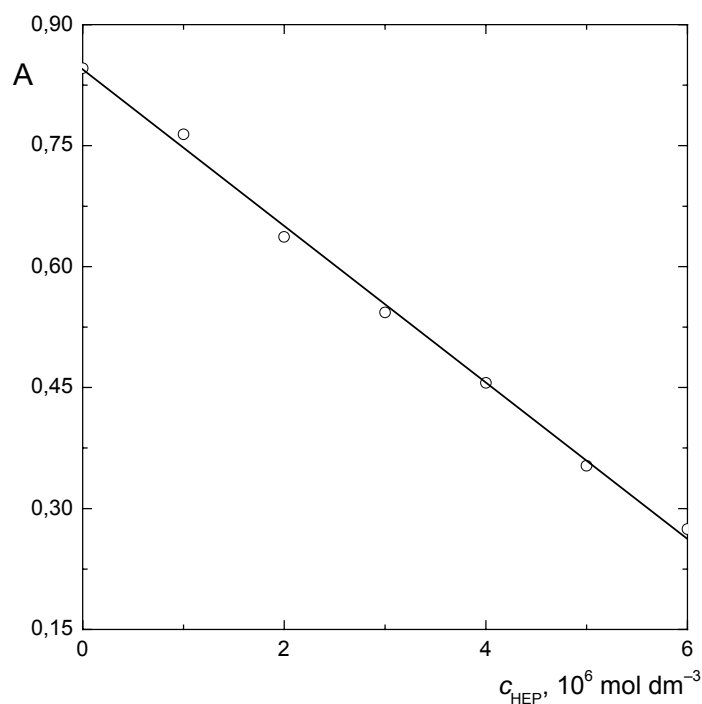


Obr. 4.2 Jobova funkce kontinuálních variací komplexu safraninu a heparinu ($c_{\text{SF}} + c_{\text{HEP}} = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) měřená při $\lambda = 520 \text{ nm}$. Měřeno v 1 cm kvetě.

Pro spektrofotometrické stanovení heparinu bylo využito faktu, že v jeho přítomnosti dochází k poklesu absorpance vodného roztoku safraninu. Při vlnové délce absorpčního maxima 520 nm byla proměřena kalibrační závislost, ze které byla vynesena kalibrační přímka (obr. 4.3) v lineárním koncentračním rozsahu heparinu $0,0\text{--}6,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Kalibrační přímku lze popsat následující rovnicí

$$A = -97000 c + 0,844$$

$$r = 0,9986 \tag{4.1}$$

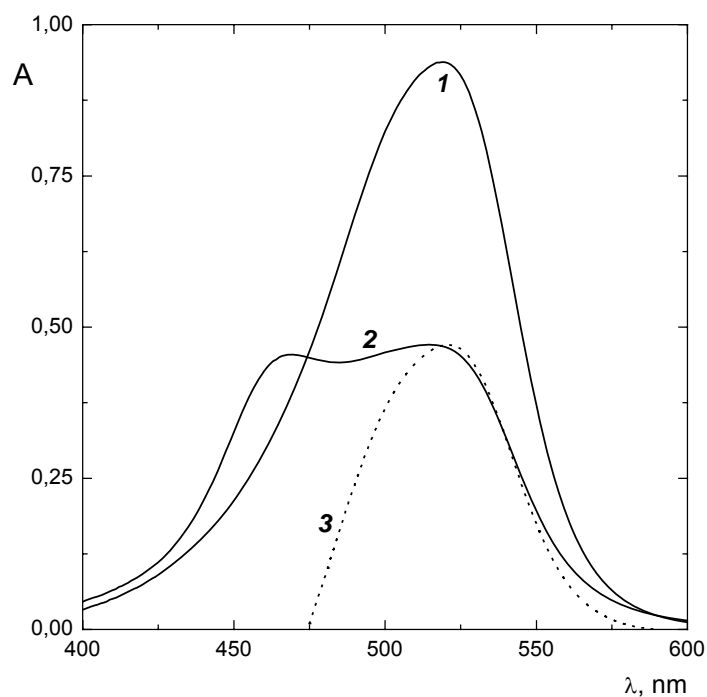


Obr. 4.3 Kalibrační křivka závislosti absorbance vodného roztoku safraninu ($c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) na koncentraci přidaného heparinu při 520 nm. Měřeno v 1 cm kyvetě.

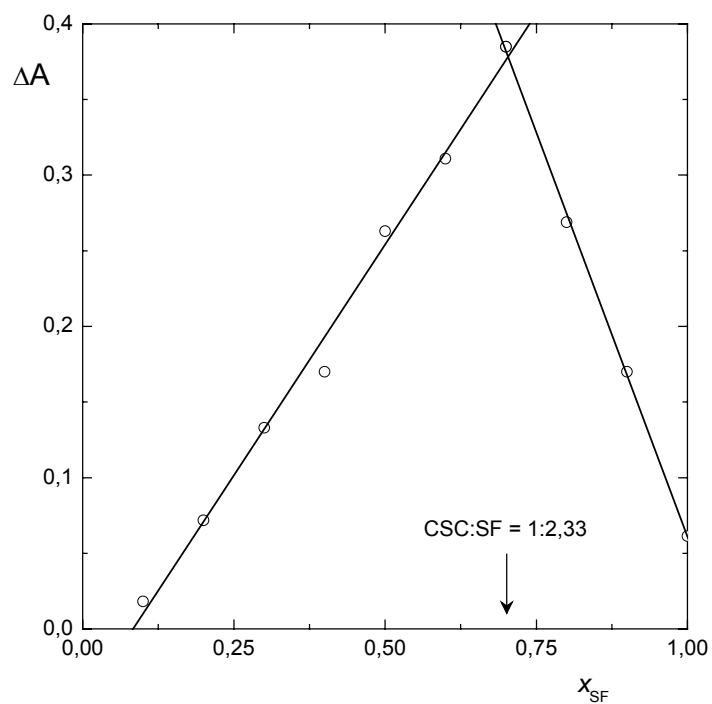
4.2.2 Chondroitin sulfát c

Na obr. 4.4 je zobrazeno absorpční spektrum vodného roztoku safraninu o koncentraci $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, které vykazuje absorpční maximum při 519 nm. V přítomnosti chondroitin sulfátu c o koncentraci $9,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ dochází k poklesu intenzity absorpčního maxima na hodnotu 515 nm. Odečtením těchto absorpčních křivek byla získána diferenční křivka, která dosahuje absorpčního maxima při 520 nm.

K určení stechiometrického poměru mezi chondroitin sulfátem c a barvivem safraninem byla použita metoda kontinuálních variací při celkové koncentraci složek $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Pomocí grafického vyhodnocení Jobovy funkce (obr. 4.5) byl poměr reagujících složek stanoven CSC:SF = 1:2,33.



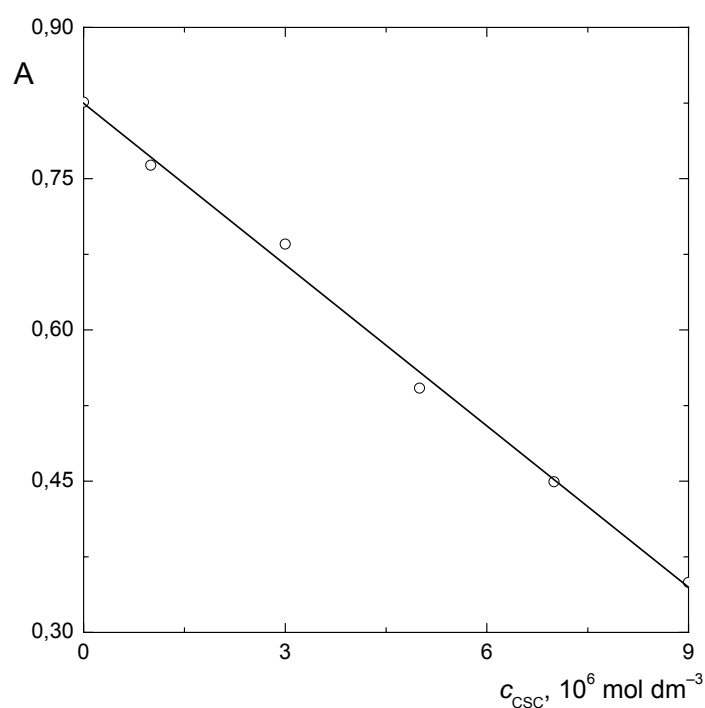
Obr. 4.4 Absorpční spektra vodných roztoků (1) safraninu ($c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), (2) safraninu ($c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) v přítomnosti chondroitin sulfátu $c = 9,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) a (3) diferenční křivka spekter (1) a (2). Měřeno v 1 cm kyvetě.



Obr. 4.5 Jobova funkce kontinuírních variací komplexu safraninu a chondroitin sulfátu ($c_{\text{SF}} + c_{\text{CSC}} = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) měřená při $\lambda = 520 \text{ nm}$. Měřeno v 1 cm kyvetě.

Pro spektrofotometrické stanovení chondroitin sulfátu c bylo využito faktu, že v jeho přítomnosti dochází k poklesu absorbance vodného roztoku safraninu. Při vlnové délce absorpčního maxima 520 nm byla proměřena kalibrační závislost, ze které byla vynesena kalibrační přímka (obr. 4.6) v lineárním koncentračním rozsahu chondroitin sulfátu c $0,0\text{--}9,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Kalibrační přímku lze popsat následující rovnicí

$$A = -53000 c + 0,825$$
$$r = 0,9978$$
(4.2)



Obr. 4.6 Kalibrační křivka závislosti absorbance vodného roztoku safraninu ($c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) na koncentraci přidaného chondroitin sulfátu c při 520 nm. Měřeno v 1 cm kyvetě.

4.2 Dynamické měření

4.2.1 Optimalizace FIA stanovení

K optimalizaci FIA stanovení glykosaminglykanů byl použit faktorový pokus, jako určující parametry byly zvoleny: průtoková rychlost nosného proudu (faktor A), dávkovaný objem vzorku (faktor B) a délka reakční cívky (faktor C). Přehled jednotlivých parametrů, jejich označení a hodnoty jejich hladin jsou uvedeny v tabulce 4.1.

Faktorový pokus byl realizován za těchto konstantních podmínek: $\lambda = 520 \text{ nm}$, $c_{\text{SF}} = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $c_{\text{GAG}} = 3,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Výsledky měření faktorového pokusu jsou zachyceny v tabulce 4.2.

Tab 4.1 Přehled optimalizovaných parametrů pro FIA stanovení glykosaminglykanů a úrovně jejich hladin

parametr	faktor	úroveň faktoru	označení
průtoková rychlost	A	2 ml min ⁻¹	-
		4 ml min ⁻¹	+
objem dávkovaného vzorku	B	30 μl	-
		100 μl	+
délka reakční cívky	C	0 cm	-
		40 cm	+

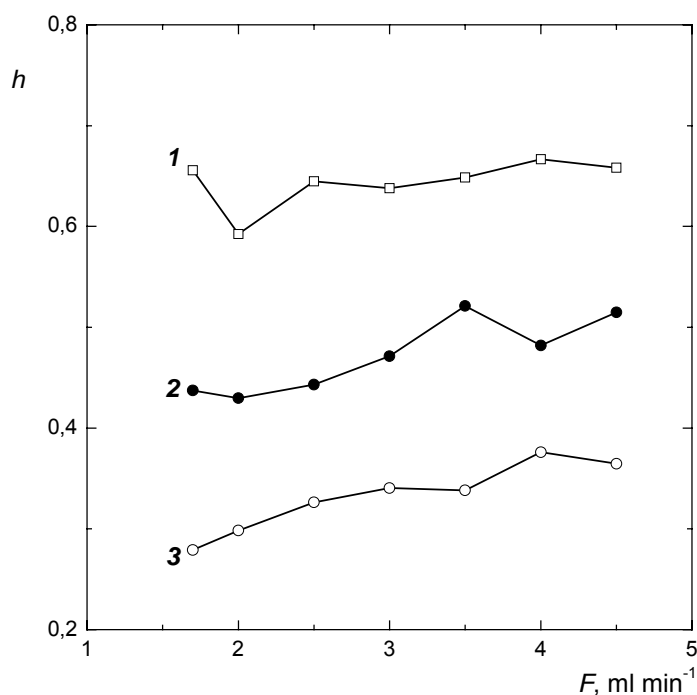
Tab 4.2 Přehled závislosti výšky FIA píků heparinu a chondroitin sulfátu c na úrovních sledovaných faktorů ($\lambda = 520 \text{ nm}$, $c_{\text{SF}} = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $c_{\text{HEP}} = 3,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $c_{\text{CSC}} = 3,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$)

úroveň faktoru			h	
A	B	C	HEP	CSC
-	-	-	0,347	0,277
-	-	+	0,193	0,183
-	+	+	0,501	0,507
+	-	-	0,308	0,372
+	+	+	0,517	0,522
+	+	-	0,631	0,673
+	-	+	0,210	0,185
-	+	-	0,589	0,638

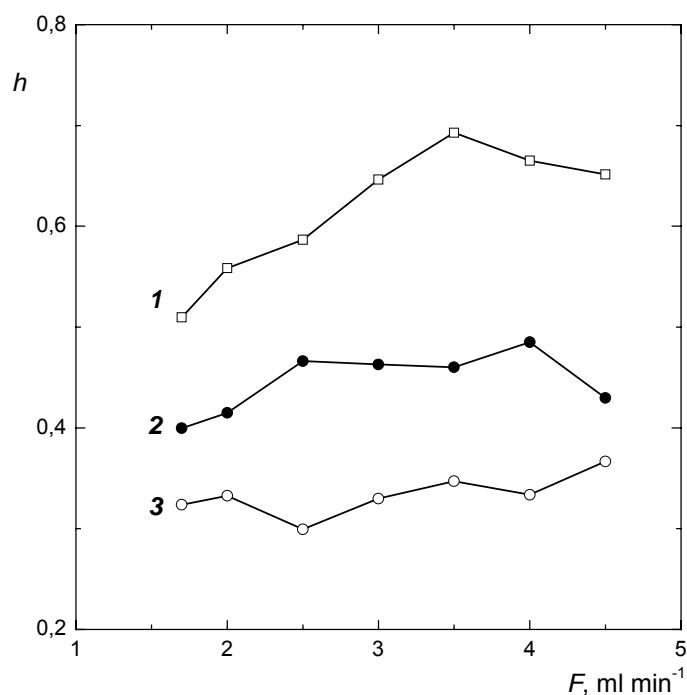
Tab 4.3 Vypočítané váhy optimalizovaných faktorů a jejich kombinací ($\lambda = 520 \text{ nm}$, $c_{\text{SF}} = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $c_{\text{HEP}} = 3,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $c_{\text{CSC}} = 3,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$)

faktor, kombinace	A	B	C	AB	BC	AC
w_i HEP	0,009	0,295	-0,113	0,020	0,013	0,008
CSC	0,036	0,331	-0,141	-0,012	-0,001	-0,028

Z naměřených výsledků faktorového pokusu byly vypočítány váhy optimalizovaných faktorů a jejich kombinací (tab. 4.3). Je zřejmé, že největší vliv na výšku FIA píku pro obě studované látky měl dávkovaný objem vzorku (faktor B) s optimální úrovní (+), tedy 100 μl . Další sledované parametry měly velmi malý nebo negativní vliv. Druhým významným parametrem v případě chondroitin sulfátu c byla průtoková rychlost nosného proudu (faktor A) s optimální úrovní (+), tedy 4 ml min^{-1} a pro heparin kombinace obou těchto faktorů. Proto bylo dále provedeno podrobnější měření vlivu průtokové rychlosti nosného proudu a dávkovaného objemu vzorku na výšce FIA píku pro heparin (obr. 4.7) a chondroitin sulfát c (obr. 4.8). Délka reakční cívky (faktor C) vyšla jako zanedbatelný efekt, proto byla reakční cívka z aparatury vyřazena.



Obr. 4.7 Závislost výšky FIA píku h na průtokové rychlosti nosného proudu při dávkovaném objemu heparinu (1) 100 μl , (2) 50 μl a (3) 30 μl ($\lambda = 520 \text{ nm}$, $c_{\text{SF}} = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $c_{\text{HEP}} = 3,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$)



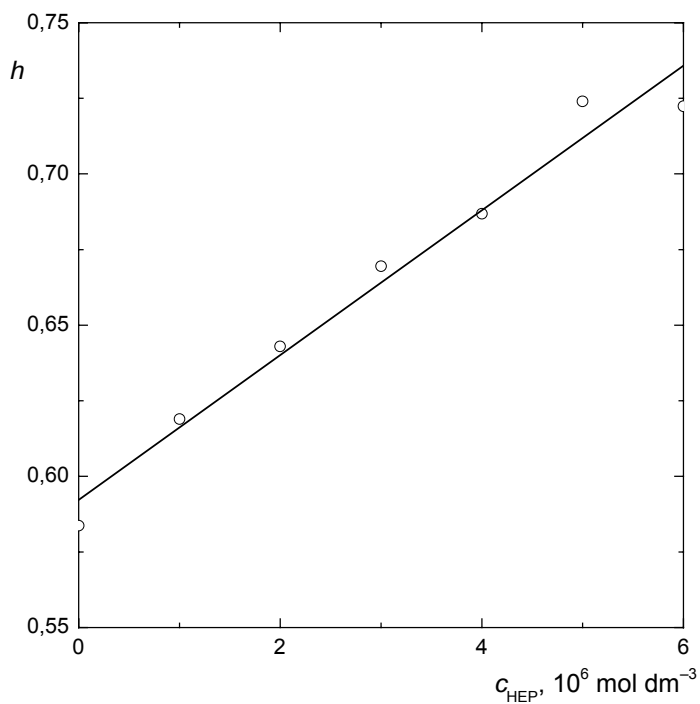
Obr. 4.8 Závislost výšky FIA píku h na průtokové rychlosti nosného proudu při dávkovaném objemu chondroitin sulfátu c (1) 100 μl , (2) 50 μl a (3) 30 μl ($\lambda = 520 \text{ nm}$, $c_{\text{SF}} = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $c_{\text{CSC}} = 3,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$)

Z výsledku faktorového pokusu a následného měření vlivu průtokové rychlosti a objemu dávkovaného vzorku plyne, že nejvýznamnější efekt na FIA stanovení glykosaminglykanů má dávkovaný objem vzorku, který čím větší je, tím citlivější je odezva detektoru na přítomný vzorek, proto byl dávkován objem 100 μl . Vliv průtokové rychlosti je velmi malý, ale při větším průtoku dochází k menší dispersi vzorku a je možné častější dávkování, proto byl vybrán parametr s vyšší hodnotou 4 ml min^{-1} .

4.2.2 Kalibrační přímka

Kalibrační přímka pro FIA stanovení heparinu (obr. 4.9) byla proměřena v lineárním dynamickém rozsahu koncentrací $0,0\text{--}6,0 \times 10^{-6}$ mol dm^{-3} heparinu. Kalibrační přímku heparinu lze popsat následující rovnicí

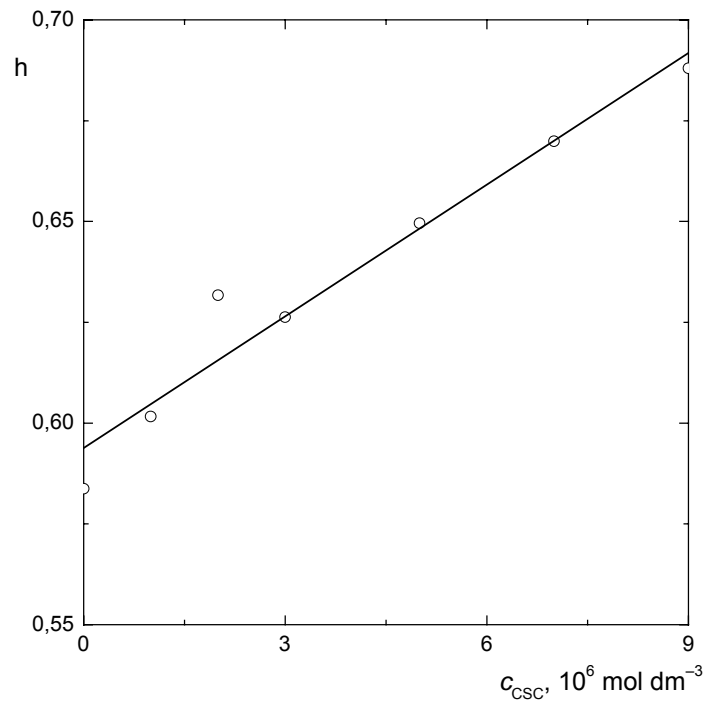
$$h = 24000 c + 0,592$$
$$r = 0,9864 \quad (4.3)$$



Obr. 4.9 Kalibrační přímka stanovení heparinu FIA metodou se spektrofotometrickou detekcí
($c_{\text{SF}} = 3,0 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3} , $V_{\text{HEP}} = 100 \mu\text{l}$, $F = 4 \text{ ml min}^{-1}$, $\lambda = 520 \text{ nm}$)

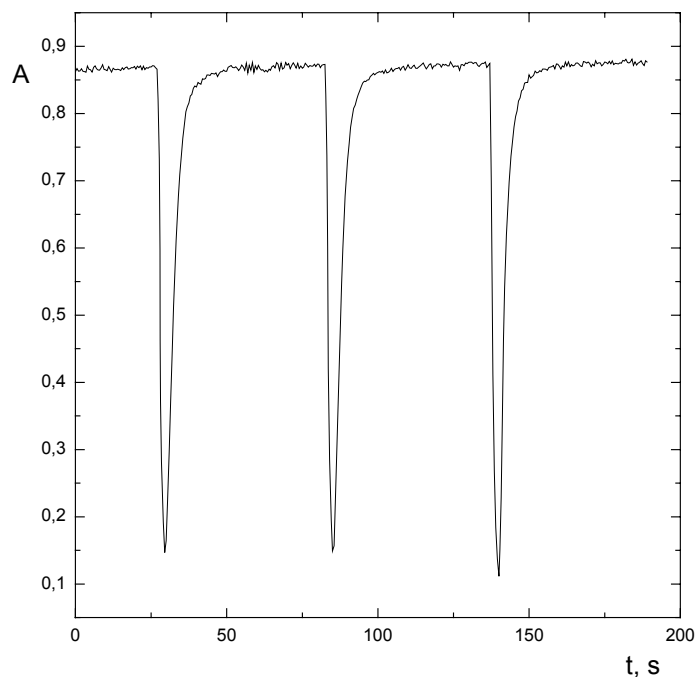
Kalibrační přímka pro FIA stanovení chondroitin sulfátu c (obr. 4.10) byla proměřena v lineárním dynamickém rozsahu koncentrací $0,0\text{--}9,0 \times 10^{-6}$ mol dm^{-3} chondroitin sulfátu c . Kalibrační přímku chondroitin sulfátu c lze popsat následující rovnicí

$$h = 11000 c + 0,594$$
$$r = 0,9757$$
(4.4)



Obr. 4.10 Kalibrační přímka stanovení chondroitin sulfátu c FIA metodou se spektrofotometrickou detekcí
($c_{\text{SF}} = 3,0 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3} , $V_{\text{CSC}} = 100 \mu\text{l}$, $F = 4 \text{ ml min}^{-1}$, $\lambda = 520 \text{ nm}$)

Hodnota maximální vzorkovací frekvence S_{\max} byla vypočtena pomocí výrazu (3.3) pro obě studované látky z průměrných hodnot šířek FIA píků při základně získaných z fiagramů naměřených pro nejvyšší koncentraci příslušného glykosaminglykanu. Pro ilustraci je na obr. 4.11 uveden fiagram heparinu o koncentraci $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Stanovené hodnoty maximální vzorkovací frekvence jsou uvedeny v tab. 4.4.



Obr. 4.11 Fiagram tří stanovení heparinu o koncentraci $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$
 ($c_{\text{SF}} = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $V_{\text{HEP}} = 100 \text{ } \mu\text{l}$, $F = 4 \text{ ml min}^{-1}$, $\lambda = 520 \text{ nm}$)

Tab 4.4 Koncentrace glykosaminglykanů použité pro stanovení maximální dávkovací frekvence, odpovídající šířky FIA píků při základně a vypočítaná maximální dávkovací frekvence ($c_{\text{SF}} = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $V_{\text{GAG}} = 100 \text{ } \mu\text{l}$, $F = 4 \text{ ml min}^{-1}$, $\lambda = 520 \text{ nm}$)

	$c, 10^6 \text{ mol dm}^{-3}$	$\Delta t, \text{ s}$	$S_{\max}, \text{ h}^{-1}$
heparin	6,0	26	138
chondroitin sulfát <i>c</i>	9,0	24	150

5 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo navrhnout a optimalizovat metodu průtokové injekční analýzy se spektrofotometrickou detekcí pro stanovení glykosaminglykanů založenou na tvorbě komplexu mezi ionty záporně nabitých molekul glykosaminglykanů s azinovým barvivem safraninem ve vodném prostředí. Pro spektrofotometrickou detekci bylo využito faktu, že tvorba komplexu se projeví poklesem intenzity absorpčního maxima vodného roztoku safraninu.

V statické části měření byla nalezena vhodná vlnová délka pro stanovení 520 nm. Poměry reagujících složek byly stanoveny metodou kontinuálních variací, pro heparin byl poměr stanoven HEP:SF = 1:3,21 a pro chondroitin sulfát *c* na CSC:SF = 1:2,33. Z těchto rozdílných poměrů reagujících složek je patrný i rozdíl, proč příslušné glykosaminglykany byly při proměření kalibračních přímek lineární v jiném koncentračním rozsahu; kalibrační závislost heparinu byla lineární v koncentračním rozmezí $0,0\text{--}6,0 \times 10^{-6}$ mol dm⁻³ a chondroitin sulfátu *c* v rozsahu $0,0\text{--}9,0 \times 10^{-6}$ mol dm⁻³.

V dynamické části měření byla navržena aparatura pro průtokovou injekční analýzu stanovení studovaných glykosaminglykanů. Pomocí faktorového pokusu byla provedena optimalizace FIA měření. Bylo zjištěno, že největší vliv měl dávkovaný objem vzorku a čím je větší, tím citlivější je odezva detektoru na přítomný vzorek. Ostatní parametry byly proti tomu zanedbatelné nebo měly negativní vliv. Protože při větší průtokové rychlosti dochází k menší dispersi vzorku a častějšímu dávkování, bylo dále provedeno podrobnější měření vlivu průtokové rychlosti nosného proudu a dávkovaného objemu vzorku. Jako optimální parametry měření proto byly stanoveny: průtoková rychlost nosného proudu 4 ml min⁻¹, objem dávkovaného vzorku 100 μl a reakční cívka pro její negativní vliv nebyla použita. Za těchto podmínek byla pro FIA stanovení glykosaminglykanů proměřena kalibrační závislost v příslušném lineárním rozsahu koncentrací. Z fiagramů, které odpovídaly nejvyšší koncentraci dané látky v kalibrační přímce byly vypočítány hodnoty maximální vzorkovací frekvence pro heparin 138 vzorků za hodinu a pro chondroitin sulfát *c* 150 vzorků za hodinu.

Literatura

- [1] Gandhi, N. S.; Mancera, R. L.: The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chemical Biology & Drug Design* **72** (2008), 455–482.
- [2] Korir, A. K.; Larive, C. K.: Advances in the separation, sensitive detection, and characterization of heparin and heparan sulfate. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **393** (2009), 155–169.
- [3] Rabenstein, D. L.: Heparin and heparan sulfate: Structure and function. *Natural Product Reports* **19** (2002), 312–331.
- [4] Hampl, F.; Rádl, S.; Paleček J.: *Farmakochemie*. Praha, VŠCHT 2007, str. 274.
- [5] Lincová, D.; Farghali, H. *et al.*: *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha, Galén 2007, str. 274.
- [6] Němcová, I.; Rychlovský, P.; Havelcová, M.; Brabcová, M.: Determination of heparin using flow injection analysis with spectrophotometric detection. *Analytica Chimica Acta* **401** (1999), 223–228.
- [7] Smith, A. D.; Datta, S. P.; Smith, G. H.; Campbell, P. N. Bentley, R.: *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. New York, Oxford University Press 2000, p. 114.
- [8] Pospíchal, R.; Nesměrák, K.; Rychlovský, P.; Němcová, I.: Determination of chondroitin sulfate by thiazine dyes using flow injection analysis with spectrophotometric detection. *Analytical Letters* **40** (2007), 1167–1175.
- [9] Arient, J.: *Přehled barviv*. Praha, SNTL 1968, str. 123–126.
- [10] Rosenberg, L.: Chemical basis for the histological use of safranin O in the study of articular cartilage. *Journal of Bone and Joint Surgery* **53** (1971), 69–82.
- [11] Rao, N. V.; Sastri, C. Kamala: Azine dyes as redox indicators in titrations with chloramine-T. *Journal of the Indian Chemical Society* **64** (1987), 131–132.
- [12] Růžička, J.; Hansen, E. H.: *Flow Injection Analysis*. New York, Wiley 1981.
- [13] Harvey, D.: *Modern Analytical Chemistry*. New York, McGraw-Hill 2000, p. 649–659.
- [14] Miller, J. C., Miller, J. N.: *Statistics for Analytical Chemistry*. 2nd edition. New York, Ellis Horwood 1992.
- [15] Lhoták, P.; Stibor, I.: *Molekulární design*. Praha, VŠCHT 1997, kap. 12, str. 2–4.
- [16] Kalous, V. a kol.: *Metody chemického výzkumu*. Praha, SNTL 1987, str. 114–115.