

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Renata Tichá

PRŮTOKOVÁ INJEKČNÍ ANALÝZA VYBRANÝCH
GLYKOSAMINOGLYKANŮ
SE SPEKTROFLUORIMETRICKOU DETEKCÍ

Flow Injection Analysis of Selected Glycosaminoglycans with
Spectrofluorimetric Detection

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Karel Nesměrák, Ph.D.

Praha 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto 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.

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 25. srpna 2014.

.....

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá stanovením heparinu a chondroitin sulfátu technikou průtokové injekční analýzy se spektrofluorimetrickou detekcí. Stanovení je založeno na interakci negativně nabitého heparinu respektive chondroitin sulfátu s kationtovým barvivem (azur A nebo fenosafranin), která se projevuje poklesem intenzity fluorescence barviva v jeho emisním maximu. Byly nalezeny optimální podmínky stanovení ve statickém uspořádání a změřeny kalibrační závislosti. Byly optimalizovány podmínky FIA stanovení a zjištěny parametry: objem dávkovaného vzorku 100 μl , délka reakční cívky 60 cm, průtoková rychlost 0,7 ml min^{-1} , koncentrace azuru B $1,6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, koncentrace fenosafraninu $3,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Pro stanovení heparinu pomocí azuru B byl zjištěn $LOD = 0,023 \text{ IU ml}^{-1}$ a $LOQ = 0,186 \text{ IU ml}^{-1}$ s lineárním dynamickým rozsahem 0,19–1,43 IU ml^{-1} . Pro stanovení heparinu pomocí fenosafraninu byl zjištěn $LOD = 0,102 \text{ IU ml}^{-1}$ a $LOQ = 0,192 \text{ IU ml}^{-1}$ s lineárním dynamickým rozsahem 0,19–1,79 IU ml^{-1} . Pro stanovení chondroitin sulfátu pomocí azuru B byl zjištěn $LOD = 0,58 \text{ mg dm}^{-3}$ a $LOQ = 2,37 \text{ mg dm}^{-3}$ s lineárním dynamickým rozsahem 2,37–8,32 mg dm^{-3} . Vyvinutá stanovení byla aplikována na stanovení heparinu, resp. chondroitin sulfátu, v léčivých přípravcích.

Klíčová slova

Azur B

Fenosafranin

Glykosaminoglykany

Heparin

Chondroitin sulfát

Průtoková injekční analýza (FIA)

Spektrofluorimetrická detekce

ABSTRACT

The thesis is focused on a determination of heparin and chondroitin sulfate, using flow injection analysis with spectrofluorimetric detection. The determination is based on the interaction of negatively charged heparin, chondroitin sulfate resp., with a cationic dye (azure B or phenosafranine) which is manifested by the decrease in fluorescence intensity of the dye in its emission maximum. The optimal conditions for the determination in static mode were found, and calibration dependencies were measured. The conditions of FIA were optimized and following parameters were established: the volume of dispensed sample of 100 ml, the length of the reaction coil 60 cm, the flow rate 0.7 ml min^{-1} , the concentration of azure B $1.6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, the concentration of phenosafranine $3.5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. For the determination of heparin using azure B it was found: $LOD = 0.023 \text{ IU ml}^{-1}$, $LOQ = 0.186 \text{ IU ml}^{-1}$, and linear dynamic range $0.19\text{--}1.43 \text{ IU ml}^{-1}$. For the determination of heparin using phenosafranine it was found: $LOD = 0.102 \text{ IU ml}^{-1}$, $LOQ = 0.192 \text{ IU ml}^{-1}$, and linear dynamic range $0.19\text{--}1.79 \text{ IU ml}^{-1}$. For the determination of chondroitin sulfate using azure B it was found: $LOD = 0.58 \text{ mg dm}^{-3}$, $LOQ = 2.37 \text{ mg dm}^{-3}$, and linear dynamic range $2.37\text{--}8.32 \text{ mg dm}^{-3}$. The developed determination was applied to the determination of heparin, resp. chondroitin sulfate, in pharmaceutical preparations.

Keywords

Azure B

Chondroitin sulfate

Flow injection analysis (FIA)

Glycosaminoglycans

Heparin

Phenosafranine

Spektrofluorimetric detection

Poděkování

Děkuji vedoucímu mé diplomové práce panu RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D. za cenné rady, četné konzultace a připomínky, které mi velice pomohly při vypracování této diplomové práce. Dále děkuji své rodině a svému příteli za podporu a trpělivost při mém studiu.

Obsah

	Seznam použitých zkratek a symbolů.....	8
1	Úvod, teoretická část.....	9
1.1	Cíl diplomové práce.....	9
1.2	Metody průtokové analýzy.....	9
1.3	Průtoková injekční analýza.....	10
1.4	Molekulová fluorescenční spektrometrie.....	11
1.5	Fenosafranin.....	13
1.6	Azur B.....	14
1.7	Glykosaminoglykany.....	14
1.7.1	Heparin.....	15
1.7.1.1	Metody stanovení heparinu.....	16
1.7.2	Chondroitin sulfát.....	17
1.7.2.1	Metody stanovení chondroitin sulfátu.....	19
2	Experimentální část.....	20
2.1	Použité chemikálie.....	20
2.2	Příprava roztoků.....	20
2.3	Přístrojové vybavení a instrumentace.....	21
2.4	Aparatura použitá pro FIA stanovení.....	22
2.5	Stanovení heparinu a chondroitin sulfátu v reálných vzorcích.....	22
2.6	Zpracování naměřených dat.....	23
3	Výsledky a diskuze.....	25
3.1	Statická měření.....	25
3.1.1	Excitační spektra.....	25
3.1.2	Emisní spektra.....	27
3.1.3	Vliv pH.....	29
3.1.4	Optimalizace koncentrace kationových barviv.....	32
3.1.5	Stechiometrie reakce.....	33

3.1.6	Statické kalibrační závislosti.....	35
3.2	FIA stanovení.....	38
3.2.1	Dvouúrovňová faktorová analýza.....	39
3.2.2	Optimalizace průtokové rychlosti a délky reakční cívky.....	41
3.2.3	Optimální podmínky FIA stanovení.....	44
3.2.4	Kalibrační závislosti.....	44
3.3	Aplikace FIA stanovení na farmaceutické vzorky.....	47
4	Závěr.....	49
	Literatura.....	50

Seznam použitých zkratek a symbolů

c	koncentrace [mol dm^{-3}], [IU ml^{-1}], [mg dm^{-3}]
CS	chondroitin sulfát
FIA	průtoková injekční analýza
F	průtoková rychlost [ml min^{-1}]
GAG	glykosaminoglykany
Hep	heparin
IU	International Unit (mezinárodní jednotka) - udává aktivitu heparinu
l	délka [cm]
λ_{em}	vlnová délka emise [nm]
λ_{ex}	vlnová délka excitace [nm]
LDR	lineární dynamický rozsah
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
M	molární hmotnost [mol g^{-1}]
R	korelační koeficient
S	plocha píku [s]
s	směrodatná odchylka
s_r	relativní směrodatná odchylka
SFA	segmentová průtoková analýza
SIA	sekvenční injekční analýza
U	napětí [V]
V	objem [dm^3]
\bar{y}	průměrná hodnota měření

1 ÚVOD, TEORETICKÁ ČÁST

1.1 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo navrhnout a optimalizovat metodu pro stanovení vybraných glykosaminoglykanů (heparinu a chondroitin sulfátu) pomocí průtokové injekční analýzy se spektrofluorimetrickou detekcí za využití vybraných kationtových barviv (fenosafraninu a azuru B). Následně metodu aplikovat na reálné vzorky heparinu a chondroitin sulfátu.

1.2 METODY PRŮTOKOVÉ ANALÝZY

Metody průtokové analýzy patří mezi moderní techniky analýzy a v analytické chemii se řadí do skupiny instrumentálních technik. Jedním z podnětů vzniku průtokových metod byla potřeba provádět rychlé analýzy. Tyto metody fungují na principu nástřiku vzorku do proudu nosné kapaliny, která obsahuje vhodné reakční činidlo. Proud nosné kapaliny je realizován pomocí pístového či peristaltického čerpadla a postupným unášením reakčních zón dochází k mísení vzorku s reakčním činidlem a vzniku reakčního produktu. Produkt je unášen proudem do vhodně zvoleného detektoru. Právě díky tomuto uspořádání přinášejí průtokové metody mnoho výhod. Metody je možno plně či částečně automatizovat, což zaručuje vyšší rychlost analytického procesu a je možné je využít pro sériové analýzy. Z důvodu malých rozměrů průtokových systémů je spotřeba chemikálií oproti klasické analýze výrazně nižší [1].

Jednou z prvních průtokových metod je segmentová průtoková analýza (SFA – Segmented Flow Analysis), která vznikla v polovině 20. století. Při této metodě jsou vzorek, činidlo a ostatní složky nasávány pomocí peristaltického čerpadla do reakční cívky. Zároveň je do zařízení vháněn vzduch, jehož bublinky dělí reakční směs na serii segmentů a odděluje jednotlivé vzorky od sebe. Nevýhodou této metody je právě

vháněný vzduch, u kterého je nutné udržovat konstantní velikost bublin a před vstupem do detekční cely musí být odstraněn.

Následující z metod průtokové analýzy, která odstraňuje výše zmíněné nevýhody SFA, je průtoková injekční analýza (FIA – Flow Injection Analysis), kterou se podrobněji zabývám v kapitole 1.3.

Dalšími metodami, které je ale nutné plně automatizovat jsou například sekvenční injekční analýza (SIA – Sequence Injection Analysis) [2] či multisyringe průtoková injekční analýza (MSFIA) [3]. Tyto metody nesou spoustu výhod, jakými je například programovatelný tok nebo využití nestálých činidel, která je možno vyvíjet přímo v aparatuře. Jejich nevýhodou je složitější konstrukce a nutnost vytvořit ovládací software [4].

Průtokové metody analýzy mají stále narůstající potenciál a jsou hojně využívány například ve farmacii [5], environmentální analýze [6, 7] nebo také v lékařství [8].

1.3 PRŮTOKOVÁ INJEKČNÍ ANALÝZA

Průtoková injekční analýza byla navržena v polovině sedmdesátých let dvacátého století J. Růžičkou a E. Hansenem [9]. Základ metody spočívá v postupném dávkování vždy přesně definovaných objemů vzorků do kontinuálního proudu nosné kapaliny. Nosná kapalina je ze zásobníku čerpána pomocí pístového či peristaltického čerpadla a postupným unášením reakčních zón směrem k detektoru dochází ke dvěma procesům, k chemické reakci mezi vzorkem a reakčním činidlem a ke kontrolované disperzi vzorku v prostoru i čase. Žádný z těchto dvou procesů nedosáhne rovnováhy, ale protože jsou standardy a vzorky zpracovány stejným způsobem, je možné získat reprodukovatelné výsledky [10]. Je-li potřeba smísit vzorek s větším počtem reakčních činidel, je možné do hlavního proudu postupně zavést kanály dalších reagentů. Základní schéma aparatury pro průtokovou injekční analýzu s jedním činidlem či nosným proudem je na obr. 1.1.



Obr. 1.1: Základní schéma aparatury pro průtokovou injekční analýzu: 1 – zásobník nosného roztoku, 2 – peristaltická pumpa, 3 – dávkování vzorku, 4 – reakční cívka, 5 – detektor, 6 - odpad

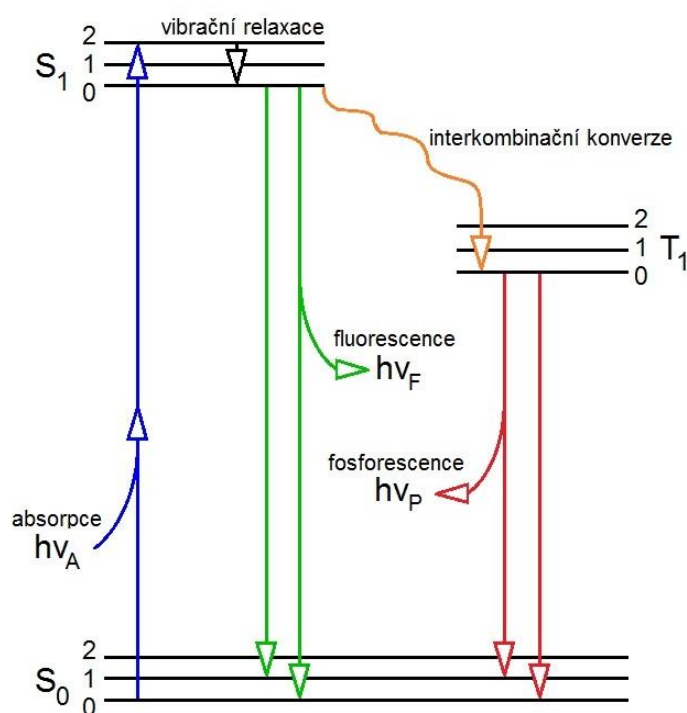
Dávkování vzorku je u FIA technik prováděno nejčastěji pomocí šesticestného dávkovacího ventilu, který zaručuje nadávkování přesně definovaného objemu vzorku. V aparatuře mohou být zařazena i další zařízení sloužící k úpravě vzorku případně produktu, například separační membrány, zařízení pro extrakci kapalina-kapalina nebo pro derivatizaci [11]. K detekci analytu se využívá spektrometrických či elektrochemických metod, nejčastěji jde o UV-VIS spektrofotometrii.

Výsledkem analýzy jsou za sebou jdoucí píky, jejichž plocha a výška jsou kvantitativní informací vzorku. Z výšky (plochy) píku lze určit citlivost dané metody a z šířky píku při základně je možné spočítat maximální frekvenci, s jakou lze vzorky dávkovat.

1.4 MOLEKULOVÁ FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE

Molekuly látek, které pohltnou energii (záření) v ultrafialové nebo viditelné oblasti ji následně ztrácejí při srážkách s jinými molekulami nebo takto mohou ztratit jen část pohlcené energie a zbylou část emitují jako takzvané luminiscenční záření. Luminiscenční záření je možné rozdělit dle povahy původně absorbované energie [12]. Pokud látka absorbuje energii ve formě světelného záření, jedná se o fotoluminiscenci, která se dále dělí podle délky dosvitu mezi absorpci záření a emisí záření a to na fluorescenci a fosforescenci.

Jev fluorescence lze nejlépe vysvětlit pomocí Jablonského diagramu (obr. 1.2). Absorpcí záření přejde jeden z párových elektronů molekulového orbitalu látky do prvního excitovaného elektronového stavu S_1 (výsledný spinový moment se nemění).



Obr. 1.2: Jablonského diagram

Elektrony mohou být excitovány na různé vibrační hladiny stavu S_1 . Excitovaná molekula obvykle ihned přechází nezářivým přechodem na nejnižší vibrační hladinu excitovaného singletového stavu S_1 . Tento proces se nazývá vibrační relaxace. Excitované molekuly také mohou přecházet tzv. interkombinační konverzí (nezářivý přechod) z nejnižšího vibračního stavu S_1 na vyšší hladinu excitovaného tripletového stavu T_1 , kdy v systému existují dva elektrony se stejným spinem. Tento stav má dlouhou dobu života, protože přechod do stavu S_0 je spinově zakázaný. Zářivý přechod ze stavu S_1 nebo T_1 na jakoukoliv vibrační hladinu základního singletového stavu S_0 se obecně nazývá luminiscence. Podle délky dosvitu rozlišujeme luminiscenci s krátkým (fluorescence) nebo dlouhým (fosforescence) dosvitem. Energie emitovaného záření je vždy nižší než energie záření excitačního, což znamená, že emitované světlo má větší vlnovou délku [13].

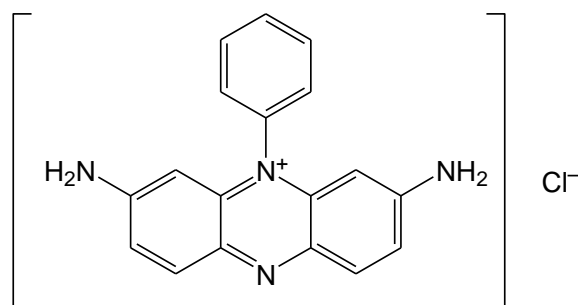
Molekuly schopné fluoreskovat se obecně nazývají fluorofory. Jsou to látky obsahující konjugované dvojné vazby nebo cyklické struktury s několika π vazbami. Velmi často fluoreskují také látky složené z několika aromatických jader, které mohou

obsahovat i heteroatomy.

Spektrofluorimetrie je využívána v praxi především díky své vysoké citlivosti a selektivitě ve srovnání s fotometrickými metodami [12]. V analytické chemii je spektrofluorimetrie často využívána jako detekční technika pro separační a průtokové techniky.

1.5 FENOSAFRANIN

Fenosafranin (CAS [81-93-6]), systematicky 3,7-diamino-5-fenylfenazinium chlorid ($C_{18}H_{15}ClN_4$), patří do skupiny kationtových barviv. Molární hmotnost této látky je $322,79 \text{ g mol}^{-1}$. Strukturní vzorec fenosafraninu je zobrazen na obrázku 1.3. Jedná se o tmavě zelený prášek rozpustný ve vodě a ethanolu [14]. Absorpční maximum fenosafraninu je při vlnové délce 518 nm.

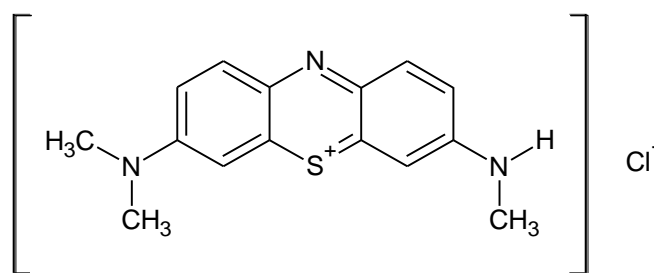


Obr. 1.3: Struktura fenosafraninu

Fenosafranin je používán jako biologické barvivo k detekci mikrobiálních kontaminantů v rostlinných tkáňových kulturách [15]. Může být také využíván k výrobě modifikovaných uhlíkových elektrod a pomocí takto vyrobených elektrod je možné stanovit NADH [16, 17]. Další z možností, jak využít fenosafranin, je stanovení dusitanů. Toto stanovení spočívá v diazotaci aminoskupiny fenosafraninu, čímž dochází k poklesu absorbance a tento pokles je přímo úměrný množství dusitanů ve vzorku [18]. V řadě stanovení se využívá také jeho tvorby iontových asociátů s řadou různých aniontů, například stanovení kyseliny hyaluronové lineární voltametrií [19], spektrofluorimetrické stanovení antihistaminika akrivastinu [20] nebo spektrofotometrické stanovení heparinu a chondroitinu sulfátu [21].

1.6 AZUR B

Azur B (CAS [531-55-5]), systematicky 3-methylamino-7-dimethylamino-fenothiazin chlorid ($C_{15}H_{16}N_3SCl$), patří do skupiny fenothiazinových barviv. Molární hmotnost je $305,83 \text{ g mol}^{-1}$. Strukturální vzorec této látky je zobrazen na obrázku 1.4. Jedná se o tmavě zelený prášek rozpustný ve vodě a mírně v ethanolu [14]. Absorpční maximum azuru B je při vlnové délce 645 nm.



Obr. 1.4: Struktura azuru B

Azur B se spolu s eozinem používá v cytologii k tzv. Giemsa-Romanowsky barvení, což je způsob barvení krevních nátěrů [22]. Velmi jednoduchou metodou je stanovení různých prvků za pomoci azuru B, kdy analyzovaný prvek reaguje s jodidem draselným v kyselém prostředí za vzniku jodu, což vede ke snížení absorbance. Touto metodou je možno stanovit například vanad [23], měď [24], selen [25] nebo arsen [26]. Známá jsou také spektrofotometrická stanovení penicilinu [27] a sacharinu [28], stanovení aminokyselin kapilární zónovou elektroforézou se spektrofluorimetrickou detekcí [29] nebo stanovení polyakrylamidu ve vzorcích vody rezonančním Rayleighovým rozptylem záření [30].

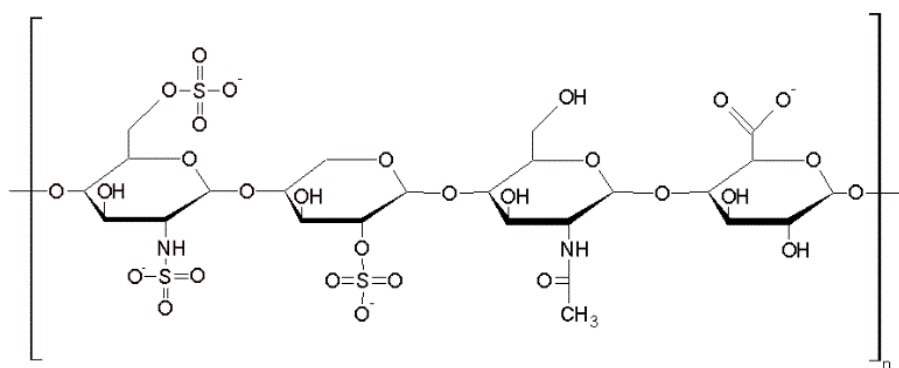
1.7 GLYKOSAMINOGLYKANY

Glykosaminoglykany (GAG), dříve nazývané mukopolysacharidy, patří do skupiny heteropolysacharidů. Jsou to dlouhé nevětvené heteropolysacharidové řetězce tvořené opakujícími se disacharidovými jednotkami, v nichž je vždy jedním členem uronová kyselina (D-glukuronová, L-induronová) a druhým glykosamin (acetylglukosamin,

acetylgalaktosamin). U většiny glykosaminoglykanů je jedna nebo více hydroxylových skupin na aminocukru esterifikována kyselinou sírovou. Vazbou glukosaminglykanů na bílkoviny vznikají proteoglykany, které představují základní složku pojivových tkání. K běžně vyskytujícím se glykosaminoglykanům patří např. kyselina hyaluronová, chondroitin sulfát, heparin, dermatan sulfát a keratan sulfát [31–34].

1.7.1 Heparin

Heparinovou molekulu tvoří lineární řetězec, ve kterém se střídá uronová (D-glukuronová, L-induronová) kyselina připojená α (1-4) vazbou ke glukosaminu. Struktura heparinu je znázorněna na obr. 1.5. Délka řetězců není konstantní, proto se jeho molekulová hmotnost pohybuje mezi 4 000 a 40 000 Da [35]. Vysoký počet karboxylových a sulfátových skupin způsobuje, že každá disacharidová jednotka heparinu nese 3–4 negativní náboje. Heparin tak má největší negativní náboj ze všech doposud známých biologických makromolekul [36].



Obr. 1.5: Struktura heparinu

Heparin je možné rozdělit na standardní (nefrakcionovaný) a nízkomolekulární heparin. Standardní heparin se dále dělí na endogenní a exogenní. Endogenní heparin je látka tělu vlastní a vyskytuje se spolu s histaminem v žírných buňkách. Ve vysoké koncentraci se vyskytuje především v játrech, plicích a ve střevní sliznici [37]. Jeho fyziologický význam není doposud plně znám [38]. Exogenní heparin se běžně získává ze střevní sliznice vepřů a z hovězích plic. Tento heparin je využíván v medicíně jako

antikoagulant, tedy látka působící proti srážení krve [39]. Antikoagulační působení heparinu je založeno na vazbě s antitrombinem III a tento komplex se váže na trombin a další aktivované koagulační faktory. U navázaného trombinu je znemožněna vazba na fibrinogen, čímž se zabrání vzniku fibrinu a fibrinové sítě [40]. Heparin tisícinásobně urychluje připojení antitrombinu III na aktivované faktory srážení [35].

Nízkomolekulární heparin se získává štěpením standardního heparinu na fragmenty o molekulové hmotnosti 2 000 až 9 000 Da [37]. Má lepší antikoagulační účinky a vykazuje méně nežádoucích účinků než standardní heparin. Mechanismus účinku spočívá především v inhibici koagulačního faktoru X_a .

Délka řetězců heparinu není konstantní, ale jelikož antikoagulační účinek závisí na délce řetězce, používá se ke standardizaci antikoagulační účinnosti ve srovnání s referenčním mezinárodním standardem, která se vyjádřuje v mezinárodních jednotkách (IU – International Unit) [35].

1.7.1.1 Metody stanovení heparinu

Pro stanovení heparinu byla vyvinuta již celá řada metod. V lékových formách je heparin stanovován biochemicky; například lékopisné stanovení je založeno na porovnání schopnosti snižovat srážení ovčí plasmy stanovovaného heparinu s referenčním standardem [41]. Dalšími metodami, kterými je možno stanovit heparin, jsou například rezonanční Rayleighův rozptyl záření a to jak ve statickém [42–44], tak v průtokovém uspořádání [45], vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem rozptylu světla [46], cyklická voltametrie založená na interakci heparinu s methylenovou modří [47] nebo lineární voltametrie založená na interakci s methylovou zelení [48], potenciometrie s polykationově-selektivní membránovou elektrodou [49] nebo s potenciometrickým senzorem pro stanovení heparinu [50]. Popsány jsou také metody spektrofluorimetrické, kdy heparin zvyšuje intenzitu fluorescence norfloxacin-ceritého komplexu [51] nebo tetracyklin-europitého komplexu [52] nebo naopak metody založené na zhášení fluorescence fluorescein-isothiokyanát-protaminu reakcí s heparinem [53]. Spektrofotometrická stanovení jsou založena na interakci negativně nabitého heparinu s kationovými barvivami, vedoucí ke vzniku komplexu projevující se změnou absorbance barviva [21]. Kromě statických

uspořádání bylo navrženo i stanovení průtokovou injekční analýzou [54]. Jsou také popsány metody pro stanovení nízkomolekulárního heparinu a to například afinitní kapilární elektroforézou [55] nebo vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s detektorem diodového pole a hmotnostním spektrometrem [56]. V poslední době se vývoj zaměřuje na metody zabývající se analýzou kontaminovaného heparinu [57, 58].

Následující tab. 1.1 porovnává meze detekce (*LOD*) a lineární dynamické rozsahy (*LDR*) pro výše popsané metody stanovení heparinu.

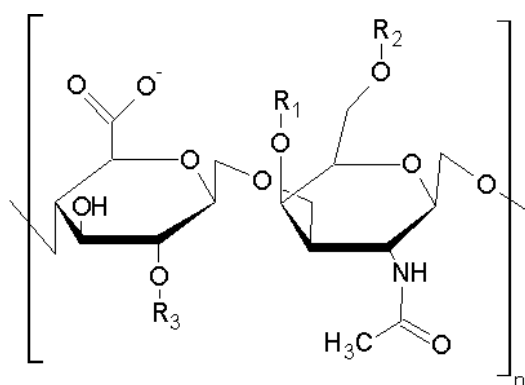
Tab.1.1 Porovnání mezi detekce (*LOD*) a lineárních dynamických rozsahů (*LDR*) pro vybrané metody stanovení heparinu.

metoda	<i>LOD</i> [$\mu\text{g dm}^{-3}$]	<i>LDR</i> [mg dm^{-3}]	ref.
rezonanční Rayleighův rozptyl	1,3	0,05–1,60	[42]
FIA-rezonanční Rayleighův rozptyl	6,4	0,01–6,00	[45]
HPLC-rozptyl světla	200,0	0,50–2,00	[46]
cyklická voltametrie	270,0	0,67–64,5	[47]
lineární voltametrie	280,0	0,80–20,0	[48]
spektrofluorimetrie	60,0	0,10–1,50	[51]
spektrofluorimetrie	4,5	0,02–1,60	[52]
FIA-spektrofotometrie-methylenová modř	100,0	0,00–12,5	[54]
FIA-spektrofotometrie-azur A	90,0	0,00–10,0	[54]
FIA-spektrofotometrie-azur B	90,0	0,00–10,0	[54]
FIA-spektrofotometrie-azur C	130,0	0,00–12,5	[54]

1.7.2 Chondroitin sulfát

Chondroitin sulfát je tvořen lineárním řetězcem, ve kterém se střídá D-glukuronová kyselina s acetylgalaktosaminem, spojené β (1-3) vazbou. Jedna disacharidová jednotka nese 1–2 negativní náboje podle počtu sulfátových skupin. Podle polohy sulfátové skupiny rozlišujeme několik typů chondroitin sulfátu, disacharidy s jednou sulfátovou skupinou v poloze čtyři (chondroitin sulfát A) nebo v poloze šest (chondroitin sulfát C) a disacharidy s dvěma sulfátovými skupinami v polohách 2 a 6 (chondroitin sulfát D), 4 a 6 (chondroitin sulfát E) a dále v poloze 2 a 4 (chondroitin sulfát B) [59]. Přesné

struktury disacharidových jednotek chondroitin sulfátu jsou zobrazeny na obrázku 1.6.



zkratka	název	R ₁	R ₂	R ₃
–	nesulfátovaný chondroitin	–H	–H	–H
CSA	chondroitin-4-sulfát	–SO ₃ [–]	–H	–H
CSB	chondroitin-2,4-disulfát	–SO ₃ [–]	–H	–SO ₃ [–]
CSC	chondroitin-6-sulfát	–H	–SO ₃ [–]	–H
CSD	chondroitin-2,6-disulfát	–H	–SO ₃ [–]	–SO ₃ [–]
CSE	chondroitin-4,6-disulfát	–SO ₃ [–]	–SO ₃ [–]	–H
–	chondroitin-2,4,6-trisulfát	–SO ₃ [–]	–SO ₃ [–]	–SO ₃ [–]

Obr. 1.6: Struktura chondroitin sulfátu

Chondroitin sulfát se v organismu vyskytuje ve velkém množství v mezibuněčné hmotě pojivové tkáně. Především je chondroitin sulfát významnou složkou chrupavky, kde se vyskytuje ve formě proteoglykanu [60, 61]. Hlavní mechanismus účinku chondroitin sulfátu je, že jako negativně nabitá molekula na sebe váže kladně nabitě ionty, které pomocí vodíkové vazby vážou vodu a tak ji zadržují v mezibuněčných prostorech, což přispívá především k pevnosti a pružnosti chrupavky [62]. Podle posledních studií byl prokázán pozitivní vliv při podávání chondroitin sulfátu při léčbě osteoartrózy [63–65].

Chondroitin sulfát nemá jen strukturní funkci, ale také funkci regulační v mnoha buněčných a fyziologických dějích, konkrétně při vývoji centrální nervové soustavy, hojení ran apod. [62, 66]. V jiných studiích se ukázalo, že má antioxidační účinky. Tyto účinky pravděpodobně souvisí s jeho schopností chelatování přechodných kovů, jako je měď nebo železo a zabraňuje tak vzniku Haber-Weissovy nebo Fentonovy reakce [67].

1.7.2.1 *Metody stanovení chondroitin sulfátu*

Pro analýzu chondroitin sulfátu byly již použity různé druhy vysokoúčinné kapalinové chromatografie, jako jsou například chromatografie s normální fází, reverzní fází, iontově párová chromatografie nebo iontově výměnná chromatografie [68, 69]. Pro analýzu chondroitin sulfátu se využívá také elektromigračních metod jako gelové nebo kapilární elektroforézy [70, 71]. K detekci se používají spektrofotometrické, spektrofluorimetrické, hmotnostní nebo elektrochemické detektory. Chondroitin sulfát je možno analyzovat přímo ve formě neporušených molekul, jejich fragmentů po enzymatickém rozkladu nebo po předchozí derivatizaci těchto molekul. Byly navrženy i jiné metody pro analýzu chondroitin sulfátu, například ultraúčinná chromatografie s hmotnostní detekcí [72], nukleární magnetická rezonance [73], Ramanova spektroskopie [74], rezonanční Rayleighův rozptyl záření [75]. Spektrofotometrické stanovení chondroitin sulfátu metodou FIA je založeno na interakci s fenothiazinovým barvivem, což má za následek pokles jeho absorpčního maxima [76]. V potravinových doplncích je nutné sledovat čistotu chondroitin sulfátu a zároveň sledovat, zda se chondroitin sulfát nevyskytuje jako kontaminant v jiných léčivých přípravcích, například v injekčním roztoku heparinu.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

Použitými standardy studovaných glykosaminglykanů byly:

- sodná sůl heparinu, referenční standard podle US Pharmacopoeia s certifikovaným obsahem heparinu 357 IU ml^{-1} (USP Rockville, USA),
- chondroitin sulfát A 99% (Sigma-Aldrich).

Analyzovanými vzorky léčivých přípravků byly:

- Heparin Forte Léčiva (Zentiva, ČR), injekční roztok heparinu o aktivitě $25\,000 \text{ IU ml}^{-1}$,
- Heparin Léčiva (Zentiva, ČR), injekční roztok heparinu o aktivitě $5\,000 \text{ IU ml}^{-1}$
- Flexodon, (Medicom International, ČR), potahované tablety obsahující 200 mg chondroitin sulfátu
- Altermed mobilin nápoj v sáčku (Altermed, ČR) obsahující 50 mg chondroitin sulfátu v jedné dávce.

Ostatní použité chemikálie byly analytické čistoty: azur B (Loba-Chemie, Rakousko), citronová kyselina (Lach-Ner), fenosafranin (Sigma-Aldrich), hydroxid sodný (Lach-Ner), kyselina boritá (Lach-Ner), kyselina fosforečná 85% (Lach-Ner), kyselina chlorovodíková 36% (Lach-Ner), octová kyselina 99% (Penta).

2.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

- Citrátový pufr o $\text{pH} = 5,5$ – bylo odváženo 2,1014 g citronové kyseliny a rozpuštěno ve 100 ml deionizované vody, poté bylo pH roztoku upraveno titrací roztokem hydroxidu sodného o koncentraci $2,0 \text{ mol dm}^{-3}$.

- Brittonův-Robinsonův pufr o pH 5,5 – bylo naváženo 0,2450 g kyseliny borité a kvantitativně převedeno do 100ml odměrné baňky, dále bylo přidáno přibližně 50 ml deionizované vody, 0,27 ml kyseliny fosforečné (85%) a 0,24 ml octové kyseliny (99%), následně byla baňka doplněna deionizovanou vodou po rysku, poté bylo pH roztoku upraveno titrací roztokem hydroxidu sodného o koncentraci 2,0 mol dm⁻³.

Roztoky byly uchovávány v dobře uzavíratelných baňkách, chráněných před světlem a v chladu. Deionizovaná voda používaná k přípravě roztoků byla připravena na zařízení MilliQ (Millipore).

2.3 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A INSTRUMENTACE

- pH metr Jenway 3510 (Jenway, USA) s kombinovanou elektrodou HC 103 (Theta, ČR) před každým měřením kalibrovanou na standardní pufrы pH = 4,01, 7,01 a 10,01
- ultrazvuková lázeň Sonorex RK 100 (Badelin, SRN)
- Spektrofluorimetr Aminco Bowman Series 2 (Aminco, USA) řízený softwarem AB2 Luminescence Spectrometer, vybavený křemennou kyvetou tloušťky 1 cm pro statické uspořádání a průtokovou křemennou kyvetou o objemu 10 µl pro průtokové uspořádání. Rychlost snímání vlnových délek při všech měřeních byla 1 nm s⁻¹.
- peristaltická pumpa IKA Schlauchpumpe PA-SF (Janke&Kunkel IKA-WERK) pro realizaci nosného toku
- středotlaký šesticestný ventil V-450 (Upchurch Scientific) s dávkovacími cívkami o objemu 50 a 100 µl.
- Tygonové spojovací hadičky R-3603 (Cole-Palmer).
- Reakční cívky o délkách 60, 120 a 180 cm tvořené teflonovými kapilárami (vnitřní průměr 0,5 mm) stočenými do spirál

2.4 APARATURA POUŽITÁ PRO FIA STANOVENÍ

Použitá aparatura pro spektrofluorimetrické stanovení heparinu/chondroitin sulfátu reakcí s kationtovými barvivy průtokovou injekční analýzou je znázorněna na obr. 1.1. Aparatura se skládá z peristaltické pumpy, středotlakého šesticestného ventilu, spektrofluorimetru s průtokovou kyvetou a případně reakční cívky. Její jednotlivé části byly spojeny hadičkami Tygon. Jako nosný roztok byl použit vodný roztok azuru B o koncentraci $1,6 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3} nebo vodný roztok fenosafraninu o koncentraci $3,5 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3} . Excitační vlnová délka pro azur B byla nastavena na 621 nm a pro fenosafranin na 468 nm. Emisní vlnová délka pro azur B byla nastavena na 667 nm a pro fenosafranin na 585 nm. Jako analytický signál sloužila plocha FIA píku, vyhodnocovaná v programu Origin 7.0 (Microcal).

2.5 STANOVENÍ HEPARINU A CHONDROITIN SULFÁTU V REÁLNÝCH VZORCÍCH

Analyzované injekční roztoky heparinu byly před FIA stanovením naředěny na vhodnou koncentraci takto:

- Z injekčního roztoku heparinu o koncentraci 25 000 IU ml^{-3} bylo odpipetováno 0,50 ml a v 1 000ml odměrné baňce bylo doplněno deionizovanou vodou po rysku. Výsledná koncentrace heparinu v naředěném vzorku byla 12,5 IU ml^{-3} .
- Z injekčního roztoku heparinu o koncentraci 5 000 IU ml^{-1} byl odpipetován 1,00 ml a ve 100ml odměrné baňce byl doplněn deionizovanou vodou po rysku. Výsledná koncentrace heparinu v naředěném vzorku byla 50 IU ml^{-3} .

Při stanovení obsahu chondroitin sulfátu v přípravku Flexodon byla odvážená tableta přípravku kvantitativně převedena do 500ml odměrné baňky a rozpuštěna v deionizované vodě za pomoci ultrazvukové lázně. Vzniklý roztok byl zfiltrován papírovým filtrem. Z filtrátu byl odpipetován 1,00 ml a ve 100ml odměrné baňce byl doplněn deionizovanou vodou po rysku.

Při stanovení obsahu chondroitin sulfátu v přípravku Altermed mobilin byl odvážený obsah sáčku kvantitativně převeden do 500ml odměrné baňky a rozpuštěn v deionizované vodě za pomoci ultrazvukové lázně. Vzniklý roztok byl zfiltrován papírovým filtrem. Z filtrátu byly odpipetovány 2,00 ml a ve 100ml odměrné baňce byly doplněny deionizovanou vodou po rysku.

2.6 ZPRACOVÁNÍ NAMĚŘENÝCH DAT

Naměřená data byla zpracována běžnými statistickými postupy [77]. Deanovým-Dixonovým testem byla otestována odlehlost výsledků jednotlivých měření. Výpočty byly realizovány pomocí softwarových programů Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA) a Origin 8.0 (Microcal).

Určení parametrů průtokového systému mající vliv na odezvu detektoru bylo provedeno pomocí dvouúrovňové faktorové analýzy. Tato metoda se používá při sledování většího počtu faktorů, neboť při větším počtu faktorů roste také počet jejich vzájemných interakcí. Není tedy možné provést analýzu rozptylu.

Mez detekce je nejnižší množství stanovované látky ve vzorku, které může být danou analytickou metodou detekováno a byl vypočítán podle vztahu

$$LOD = \bar{y}_B + 3s_B, \quad (2.1)$$

kde LOD je mez detekce stanovované látky, \bar{y}_B je průměrná hodnota změřeného slepého pokusu a s_B je směrodatná odchylka slepého pokusu.

Mez stanovitelnosti je nejnižší množství stanovované látky ve vzorku, které může být danou analytickou metodou kvantitativně stanoveno a byl vypočítán podle vztahu

$$LOQ = \bar{y}_B + 10s_B, \quad (2.2)$$

kde LOQ je mez stanovitelnosti stanovované látky, \bar{y}_B je průměrná hodnota změřeného slepého pokusu a s_B je směrodatná odchylka slepého pokusu.

Hodnota maximální frekvence dávkování vzorku ve FIA za hodinu byla vypočítána podle vzorce

$$S_{\max} = \frac{60}{\Delta t_b}, \quad (2.3)$$

kde S_{\max} (h^{-1}) je maximální frekvence dávkování vzorku za hodinu a Δt_b (min^{-1}) je šířka FIA píku (odpovídajícího největší koncentraci použité kalibrační přímky) při základně.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Stanovení glykosaminoglykanů heparinu, resp. chondroitin sulfátu je založeno na vzniku iontového asociátu s kationtovým barvivem (azurem B a fenosafraninem). Vznik iontového asociátu se projeví poklesem intenzity fluorescence katointového barviva.

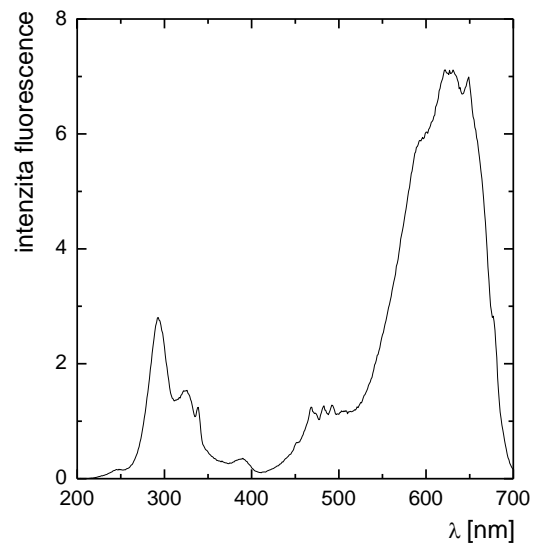
Nejprve byly nalezeny optimální podmínky pro statické uspořádání, které byly následně aplikovány a optimalizovány pro průtokové uspořádání. Metoda byla aplikována na farmaceutické vzorky.

3.1 STATICKÁ MĚŘENÍ

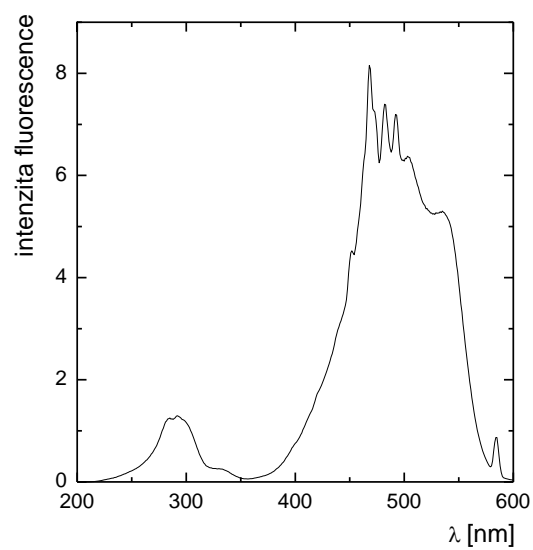
3.1.1 Excitační spektra

Nejprve byla změřena excitační spektra, aby byla nalezena optimální vlnová délka pro excitaci vybraných barviv. Excitační spektrum pro každé barvivo bylo proměřeno v jeho emisním maximu. Excitační spektrum pro azur B je zobrazeno na obr. 3.1 a bylo změřeno v rozsahu 200-700 nm, pro fenosafranin je zobrazeno na obr. 3.2 a bylo změřeno v rozsahu 200-600 nm.

Excitační maxima se nalézají poblíž absorpčních maxim jednotlivých barviv a odpovídají hodnotám 469 nm pro fenosafranin a 621 nm pro azur B.



Obr. 3.1 Excitační spektrum azuru B změřené v jeho emisním maximu 675 nm. Koncentrace azuru B $1,6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ($U_{\text{detektoru}} = 850 \text{ V}$).



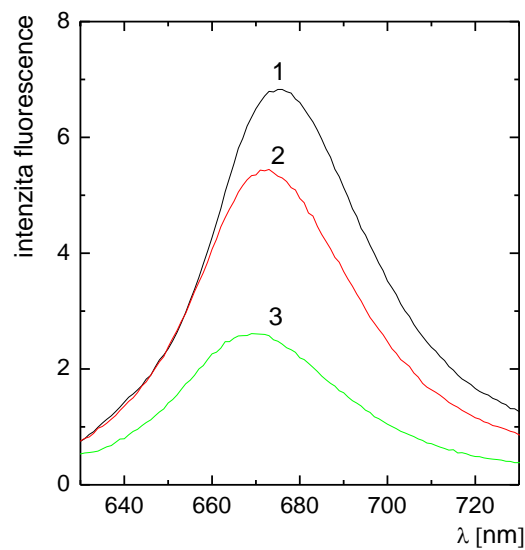
Obr. 3.2 Excitační spektrum fenošafraninu změřené v jeho emisním maximu 585 nm. Koncentrace fenošafraninu $3,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ($U_{\text{detektoru}} = 700 \text{ V}$).

3.1.2 Emisní spektra

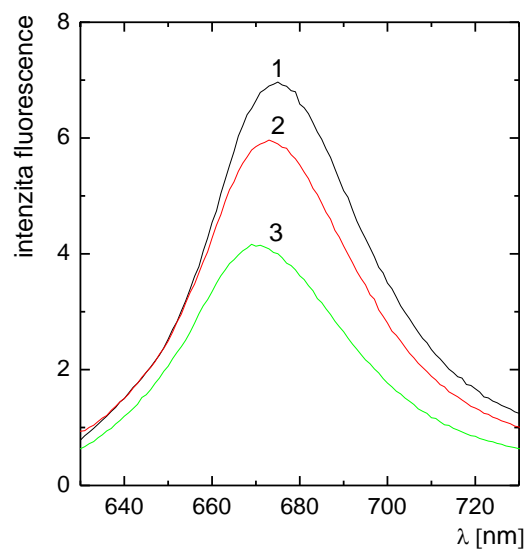
Po změření excitačních spekter byla proměřena i spektra emisní a to jak čistých barviv, tak barviv se zvyšujícím se přídatkem heparinu nebo chondroitin sulfátu. S azurem B reagovala obě barviva. V případě fenosafraninu byla situace složitější. Při reakci fenosafraninu s heparinem ve skleněných odměrných baňkách byl pozorován jen nepatrný pokles intenzity fluorescence. Při použití plastových odměrných baněk z polymethylpentenu (Vitalab) k přípravě těchto roztoků byl již tento pokles výrazný. Veškerá příprava roztoků heparinu a měření s fenosafraninem byla proto prováděna v plastových odměrných baňkách. Důvodem by mohla být v literatuře [78] uváděná možnost adsorpce heparinu nebo spíše vzniklého iontového asociátu na stěny skleněné baňky. Pro druhou možnost svědčí i to, že v případě reakce heparinu s azurem B nebyl tento jev pozorován. Při smíchání roztoků chondroitin sulfátu a fenosafraninu nejspíše nedošlo ke vzniku iontového asociátu, protože nebyl pozorován pokles fluorescence, a to ani v případě, že byla reakce prováděna v plastových odměrných baňkách, anebo nebyl vznik iontového asociátu doprovázen poklesem fluorescence.

Záznamy emisních spekter azuru B jsou zobrazeny na obr. 3.3 (přídavek heparinu) a 3.4 (přídavek chondroitin sulfátu). Emisní spektrum fenosafraninu s přídatkem heparinu je zobrazeno na obr. 3.5.

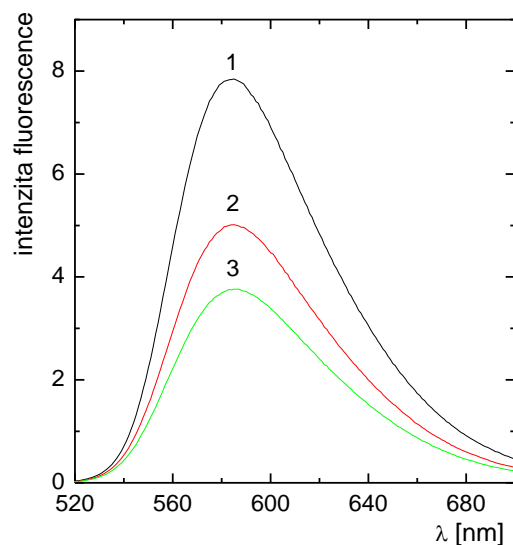
Z níže uvedených emisních spekter je dobře patrný zvyšující se pokles intenzity fluorescence kationtových barviv s rostoucí koncentrací heparinu/chondroitin sulfátu, v důsledku vzniku iontového asociátu. Emisní maxima odpovídají hodnotám 675 nm pro azur B a 585 nm pro fenosafranin. Pokles fluorescence se nejvíce projevuje v maximu emise jednotlivých barviv. U azuru B byl pozorován mírný posun fluorescenčních maxim ke kratším vlnovým délkám s rostoucí koncentrací glukosaminoglykanů, u fenosafraninu tento jev nebyl pozorován.



Obr. 3.3 Emisní spektrum azuru B se zvyšující koncentrací přidaného heparinu. Koncentrace azuru B $1,6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, koncentrace přidaného heparinu (1) 0 IU ml^{-1} (barvivo bez přídavku), (2) $0,21 \text{ IU ml}^{-1}$, (3) $0,43 \text{ IU ml}^{-1}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 621 \text{ nm}$, $U_{\text{detektoru}} = 850 \text{ V}$).



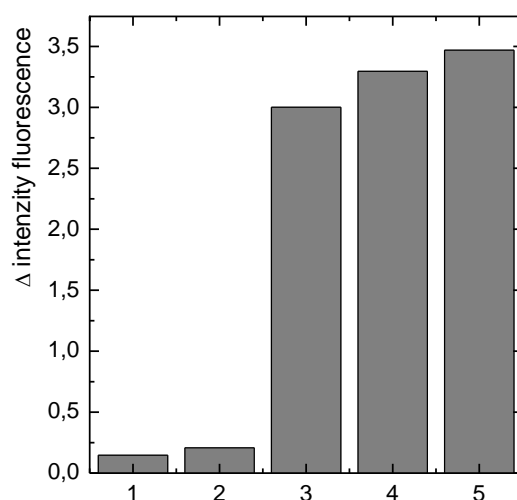
Obr. 3.4 Emisní spektrum azuru B se zvyšující koncentrací přidaného chondroitin sulfátu. Koncentrace azuru B $1,6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, koncentrace přidaného chondroitin sulfátu (1) 0 mg ml^{-1} (barvivo bez přídavku), (2) $1,56 \text{ mg ml}^{-1}$, (3) $3,12 \text{ mg ml}^{-1}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 621 \text{ nm}$, $U_{\text{detektoru}} = 850 \text{ V}$).



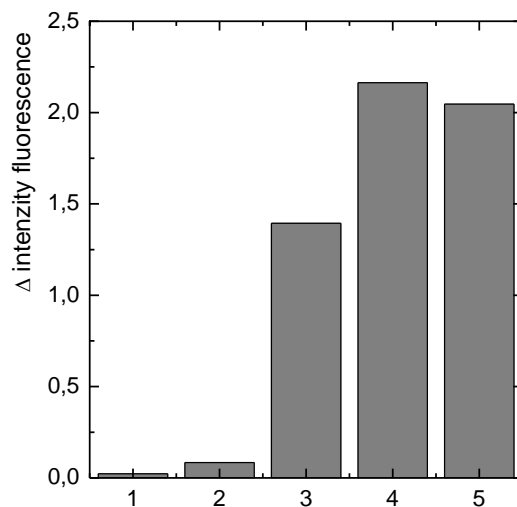
Obr. 3.5 Emisní spektrum fenošafraninu se zvyšující koncentrací přidaného heparinu. Koncentrace fenošafraninu $3,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, koncentrace přidaného heparinu (1) 0 IU ml^{-1} (barvivo bez přídavku), (2) $0,43 \text{ IU ml}^{-1}$, (3) $0,86 \text{ IU ml}^{-1}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 469 \text{ nm}$, $U_{\text{detektoru}} = 700 \text{ V}$).

3.1.3 Vliv pH

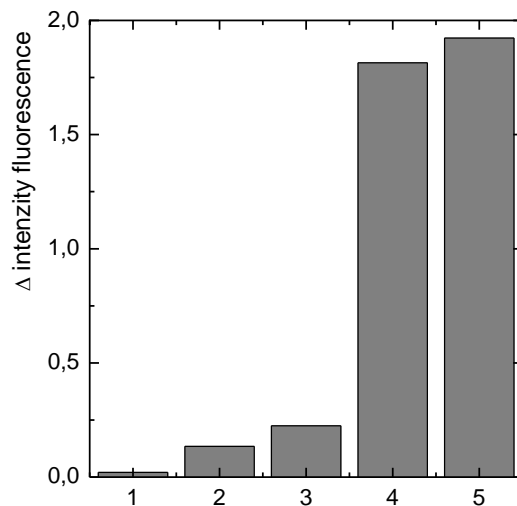
Byl studován vliv pH na tvorbu iontového asociátu mezi glykosaminoglykanem a kationovým barvivem. Pro tvorbu prostředí o daném pH byly použity pufrы a deionizovaná voda upravená na požadované pH. Byl použit citrátový a Brittonův-Robinsonův pufr, oba o $\text{pH} = 5,5$. Deionizovaná voda byla upravena kyselinou chlorovodíkovou nebo hydroxidem sodným na $\text{pH} = 4,5$; $5,5$ nebo $6,5$. Byla sledována míra poklesu fluorescence při stejném přídavku koncentrace glukosaminoglykanu. Na obr. 3.6, 3.7 a 3.8 jsou zobrazeny rozdíly mezi intenzitou fluorescence čistého barviva a barviva s přídavkem glykosaminoglykanů pro různá prostředí.



Obr. 3.6 Vliv druhu pufru, resp. pH, na rozdíl intenzity fluorescence mezi čistým azurem B ($c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) a s přidáním heparinem ($0,71 \text{ IU ml}^{-1}$): (1) citrátový pufr pH = 5,5; (2) Brittonův-Robinsonův pufr pH = 5,5; (3) deionizovaná voda s upraveným pH = 4,5; (4) deionizovaná voda s upraveným pH = 5,5; (5) deionizovaná voda s upraveným pH = 6,5 ($\lambda_{\text{ex}} = 621 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 675 \text{ nm}$, $U_{\text{detektoru}} = 850 \text{ V}$).



Obr. 3.7 Vliv druhu pufru, resp. pH, na rozdíl intenzity fluorescence mezi čistým azurem B ($c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) a s chondroitin sulfátem ($6,3 \text{ mg dm}^{-3}$): (1) citrátový pufr pH = 5,5; (2) Brittonův-Robinsonův pufr pH = 5,5; (3) deionizovaná voda s upraveným pH = 4,5; (4) deionizovaná voda s upraveným pH = 5,5; (5) deionizovaná voda s upraveným pH = 6,5 ($\lambda_{\text{ex}} = 621 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 675 \text{ nm}$, $U_{\text{detektoru}} = 850 \text{ V}$).



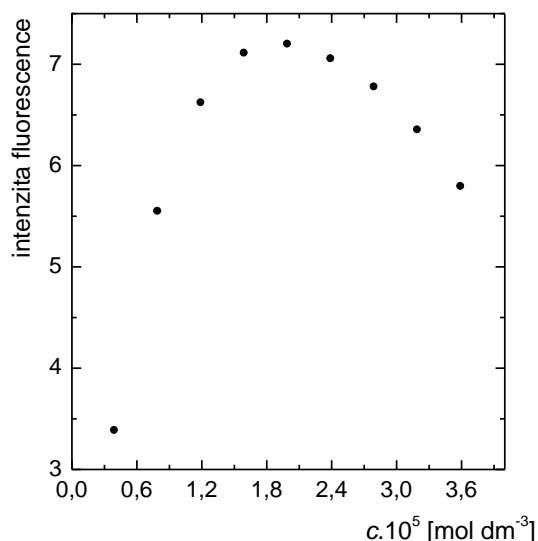
Obr. 3.8 Vliv druhu pufru, resp. pH, na rozdíl intenzity fluorescence mezi čistým fenosafraninem ($c = 1,6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) a s přidáním heparinem ($0,11 \text{ IU ml}^{-1}$): (1) citrátový pufr pH = 5,5; (2) Brittonův-Robinsonův pufr pH = 5,5; (3) deionizovaná voda s upraveným pH = 4,5; (4) deionizovaná voda s upraveným pH = 5,5; (5) deionizovaná voda s upraveným pH = 6,5 ($\lambda_{\text{ex}} = 469 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 585 \text{ nm}$, $U_{\text{detektoru}} = 750 \text{ V}$).

Bylo zjištěno, že citrátový, resp. Brittonův-Robinsonův, pufr potlačuje vznik iontového asociátu mezi glykosaminoglykanem a barvivem a došlo tak jen k nepatrnému poklesu intenzity fluorescence. Pro další spektrofluorimetrické měření bylo použití pufrů vyloučeno. Při použití deionizované vody s upraveným pH jako prostředí pro vznik iontového asociátu glykosaminglykan-barvivo byl sledován výrazný pokles intenzity fluorescence. Výjimkou byl jen velmi nízký pokles intenzity fluorescence fenosafraninu u upravené deionizované vody na pH = 4,5. Ostatní rozdíly mezi různými pH upravené deionizované vody byly malé. Proto byla jako reakční prostředí vybrána neupravená deionizovaná voda, jejíž pH je přibližně 5,5.

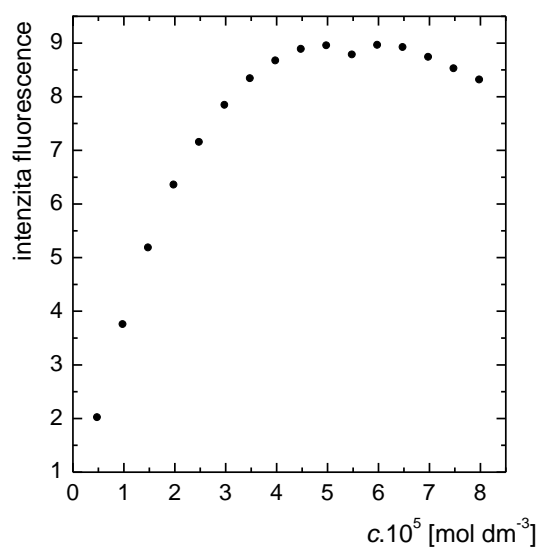
3.1.4 Optimalizace koncentrace kationových barviv

Dalším optimalizovaným parametrem byla koncentrace kationových barviv. Jako optimální koncentrace použitá pro další měření byla vybrána ta, při které bylo dosaženo nejvyšší intenzity fluorescence. Na obr. 3.8 je zobrazena závislost intenzity fluorescence na koncentraci azuru B, která byla sledována v rozmezí $0,4 \times 10^{-5} - 3,2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Závislost intenzity fluorescence na koncentraci fenosafraninu byla sledována v rozmezí $0,5 \times 10^{-5} - 8,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ a je zobrazena na obr. 3.9.

Koncentrace $1,6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ byla zvolena jako optimální pro azur B, v případě fenosafraninu byla zvolena optimální koncentrace $3,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.



Obr. 3.9 Závislost intenzity fluorescence na koncentraci azuru B ($\lambda_{\text{ex}} = 621 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 675 \text{ nm}$, $U_{\text{detektoru}} = 850 \text{ V}$, $\text{pH} = 5,5$).

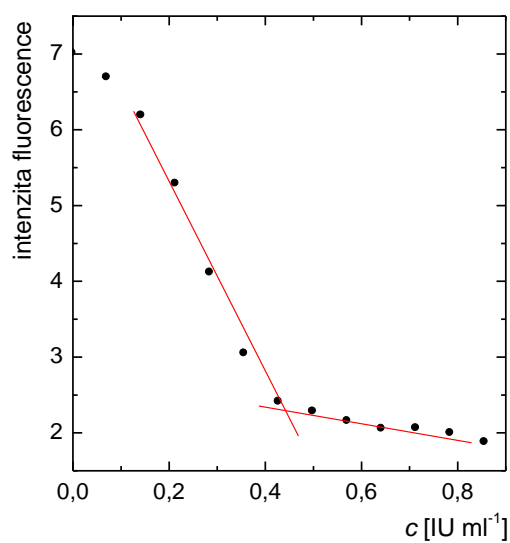


Obr. 3.10 Závislost intenzity fluorescence na koncentraci fenosafraninu ($\lambda_{\text{ex}} = 469$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 585$ nm, $U_{\text{detektoru}} = 700$ V, pH = 5,5).

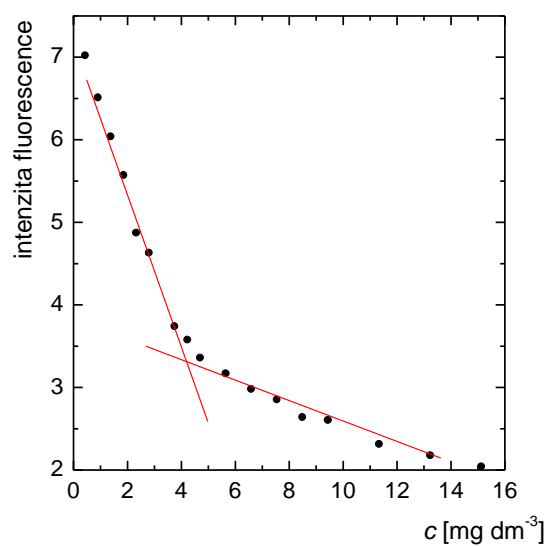
3.1.5 Stechiometrie reakce

Stechiometrie vznikajících iontových asociátů byla určena pomocí titrace barviva příslušným glykosaminoglykanem.

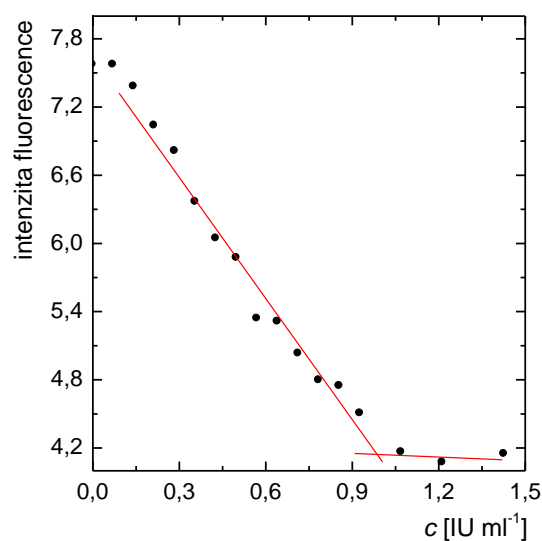
Heparin reaguje s azurem B v poměru 27×10^6 IU : 1 mol. S fenosafraninem reaguje heparin v poměru 31×10^6 IU : 1 mol. Chondroitin sulfát reaguje s azurem B v poměru 296 g : 1 mol. Odpovídající titrační křivky jsou zobrazeny na obr. 3.11, 3.12 a 3.13.



Obr. 3.11 Titrační křivka titrace azuru B heparinem. Koncentrace azuru B $1,6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 621 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 675 \text{ nm}$, $U_{\text{detektoru}} = 850 \text{ V}$, $\text{pH} = 5,5$).



Obr. 3.12 Titrační křivka titrace azuru B chondroitin sulfátem. Koncentrace azuru B $1,6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 621 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 675 \text{ nm}$, $U_{\text{detektoru}} = 850 \text{ V}$, $\text{pH} = 5,5$).

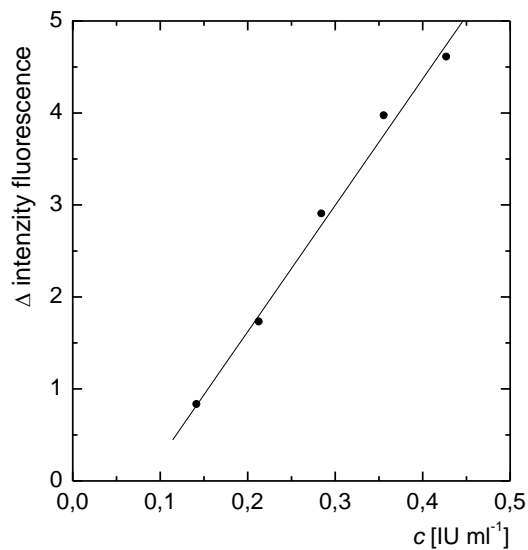


Obr. 3.13 Titrační křivka titrace fenosafraninu heparinem. Koncentrace fenosafraninu $3,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 469 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 585 \text{ nm}$, $U_{\text{detektoru}} = 700 \text{ V}$, $\text{pH} = 5,5$).

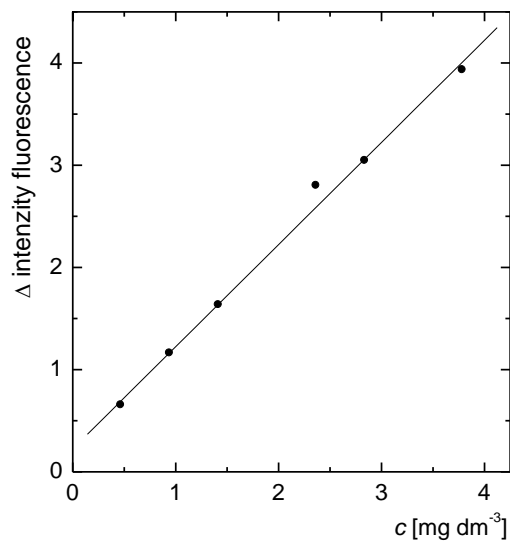
3.1.6 Statické kalibrační závislosti

Statické kalibrační závislosti byly získány odečtením intenzity fluorescence barviva s různým obsahem vybraného glykosaminoglykanu od intenzity fluorescence čistého barviva. Rozdílové signály odpovídají koncentraci vybraného glykosaminoglykanu. Byla použita vždy jen lineární část grafu, která byla proložena křivkou lineární regrese. Výsledné kalibrační závislosti jsou zobrazeny na obr. 3.14, 3.15 a 3.16.

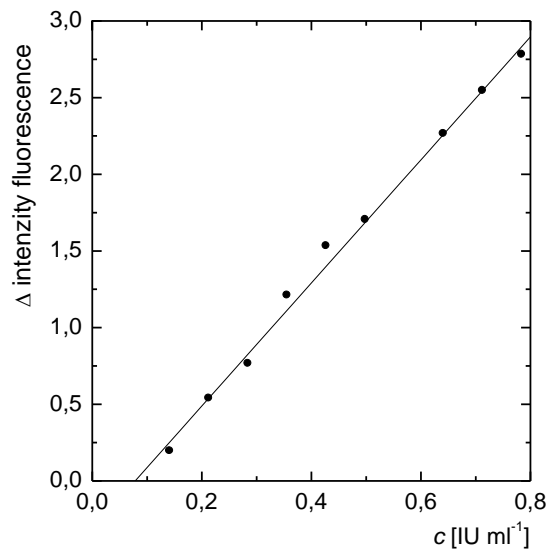
Parametry kalibračních přímek, jejich směrodatné odchylky (s), korelační koeficienty (R) a lineární dynamické rozsahy (LDR) jsou uvedeny v tab. 3.1.



Obr. 3.14 Kalibrační závislost rozdílu intenzity fluorescence azuru B ($c = 1,6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) na koncentraci přidaného heparinu ($0,14\text{--}0,43 \text{ IU ml}^{-1}$) ($\lambda_{\text{ex}} = 621 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 675 \text{ nm}$, $U_{\text{detektoru}} = 850 \text{ V}$, $\text{pH} = 5,5$).



Obr. 3.15 Kalibrační závislost rozdílu intenzity fluorescence azuru B ($c = 1,6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) na koncentraci přidaného chondroitin sulfátu ($0,47 - 3,79 \text{ mg dm}^{-3}$) ($\lambda_{\text{ex}} = 621 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 675 \text{ nm}$, $U_{\text{detektoru}} = 850 \text{ V}$, $\text{pH} = 5,5$).



Obr. 3.16 Kalibrační závislost rozdílu intenzity fluorescence fenosafraninu ($c = 3,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) na koncentraci přidaného heparinu ($0,14 - 0,79 \text{ IU ml}^{-1}$) ($\lambda_{\text{ex}} = 469 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 585 \text{ nm}$, $U_{\text{detektoru}} = 700 \text{ V}$, $\text{pH} = 5,5$).

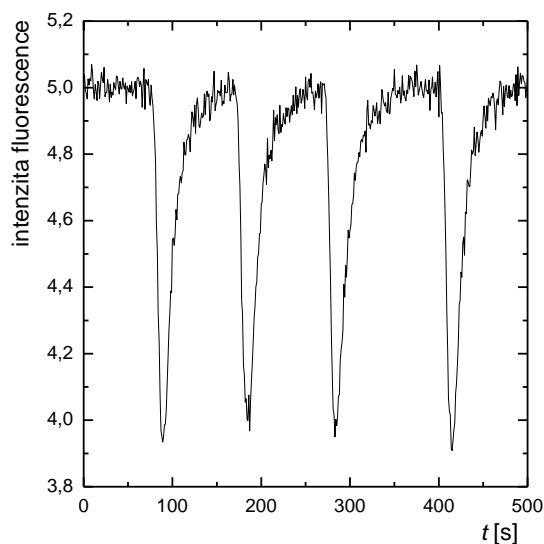
Tab. 3.1 Parametry kalibračních přímek ($y = a + bx$) pro statické stanovení glykosaminoglykanů na základě tvorby iontového asociátu s kationtovým barvivem, korelační koeficienty (R), směrodatné odchylky kalibračních přímek (s) a lineární dynamické rozsahy (LDR).

glykosaminoglykan	barvivo	a	b	R	s	LDR
chondroitin sulfát	azur B	0,2252	$0,9994 \text{ mg}^{-1} \text{ dm}^3$	0,9966	0,1150	$0,00-3,79 \text{ mg dm}^{-3}$
heparin	azur B	-1,1209	$13,7256 \text{ IU}^{-1} \text{ ml}$	0,9960	0,1609	$0,14-0,43 \text{ IU ml}^{-1}$
heparin	fenosafranin	-0,3145	$4,0143 \text{ IU}^{-1} \text{ ml}$	0,9972	0,0726	$0,14-0,79 \text{ IU ml}^{-1}$

Z parametrů kalibračních závislostí je patrné, že stanovení heparinu azurem B je citlivější než stanovení heparinu fenosafraninem. Lepší opakovatelnosti bylo naopak dosaženo pro stanovení heparinu fenosafraninem. Korelační koeficienty a lineární dynamické rozsahy jsou velmi podobné.

3.2 FIA STANOVENÍ

Pro průtokové stanovení vybraných glykosaminoglykanů se spektrofluorimetrickou detekcí byla sestavena jednoduchá aparatura zobrazená na obr. 1.1. Analyzovaný vzorek (vhodně naředěný roztok heparinu/chondroitin sulfátu) byl nadávkován do proudu nosného roztoku, kterým bylo barvivo. Koncentrace nosného roztoku azuru B byla $1,6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, v případě fenosafraninu byla koncentrace $3,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Při průchodu nadávkované zóny glykosaminoglykanu detektorem byly získány negativní píky. Pro ukázkou je na obr. 3.17 uveden FIAgram získaný při stanovení chondroitin sulfátu azurem B.



Obr. 3.17 FIA záznam nástřiku čtyř standardů chondroitin sulfátu o koncentraci $3,792 \text{ mg dm}^{-3}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 621 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 667 \text{ nm}$, $U_{\text{detektoru}} = 1125 \text{ V}$, $c_{\text{azur B}} = 1,6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $V_{\text{CS}} = 100 \text{ }\mu\text{l}$).

Na pokles fluorescence oproti základní linii mají vliv dva faktory, jednak samotné naředění barviva vodou z nastříknutého roztoku vzorku a jednak vznik iontového asociátu. Pro vyhodnocování signálu bylo vždy nutno změřit jednak samotný vzorek, ale také slepý vzorek, kterým byla čistá deionizovaná voda. Výsledný signál byl získán odečtením plochy píku slepého vzorku od plochy píku analyzovaného vzorku.

Nejprve byla opět proměřena excitační a emisní spektra obou barviv. V případě azuru B došlo k mírnému posunu emisní délky ke kratším vlnovým délkám z hodnoty

675 nm na 667 nm. Z důvodu menšího objemu průtokové kyvety bylo také nutné zvýšit napětí vložené na detektor. Všechna měření byla prováděna ve čtyřech opakováních.

3.2.1 Dvouúrovňová faktorová analýza

Jako analytický signál byla vyhodnocována plocha FIA píků. Její velikost je při FIA stanovení obecně ovlivňována několika parametry průtokového systému. Těmito parametry jsou především průtoková rychlost, objem dávkovaného vzorku a délka reakční cívky. Tyto parametry bylo nutné nejprve optimalizovat, aby bylo při FIA stanovení dosaženo maximální citlivosti a co nejmenší časové náročnosti. Nejprve byly určeny jednotlivé parametry mající vliv na odezvu detektoru pomocí dvouúrovňové faktorové analýzy. Hodnoty studovaných parametrů jsou uvedeny v tab. 3.2. Výsledky měření jsou pak uvedeny v tab. 3.3 a 3.4.

Tab. 3.2 Studované parametry při optimalizaci spektrofluorimetrického FIA stanovení vybraných glykosaminoglykanů kationovými barvivy a jejich použité úrovně.

faktor	parametr	hladina	úroveň
A	průtoková rychlost	-	1 ml min ⁻¹
		+	3 ml min ⁻¹
B	dávkovaný objem vzorku	-	50 µl
		+	100 µl
C	délka reakční cívky	-	0 cm
		+	60 cm

Tab. 3.3 Plochy FIA píkú iontového asociátu azuru B a heparinu / chondroitin sulfátu v závislosti na hladinách studovaných faktorů. ($c_{\text{azur B}} = 1,6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $c_{\text{Hep}} = 0,714 \text{ IU ml}^{-1}$, $c_{\text{CS}} = 9,0 \text{ mg dm}^{-3}$)

úrovně hladin			S_{Hep}	S_{CS}
A	B	C	[s]	[s]
-	-	-	6,812	6,731
+	-	-	3,052	2,886
-	+	-	16,282	14,229
-	-	+	8,391	8,863
+	+	-	6,969	6,473
+	-	+	3,621	3,537
-	+	+	17,770	19,798
+	+	+	7,529	6,580

Tab. 3.4 Plochy FIA píkú iontového asociátu fenosafraninu a heparinu v závislosti na hladinách studovaných faktorů. ($c_{\text{fenosafranin}} = 3,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $c_{\text{Hep}} = 0,714 \text{ IU ml}^{-1}$)

úrovně hladin			S_{Hep}
A	B	C	[s]
-	-	-	6,203
+	-	-	2,494
-	+	-	10,013
-	-	+	8,080
+	+	-	3,440
+	-	+	2,810
-	+	+	13,470
+	+	+	5,774

Významnost úrovní sledovaných parametrů a jejich vzájemných kombinací byla stanovena výpočtem váhy faktoru w_i na hladině pravděpodobnosti 0,05. Vypočtené hodnoty jsou uvedeny v tab. 3.5.

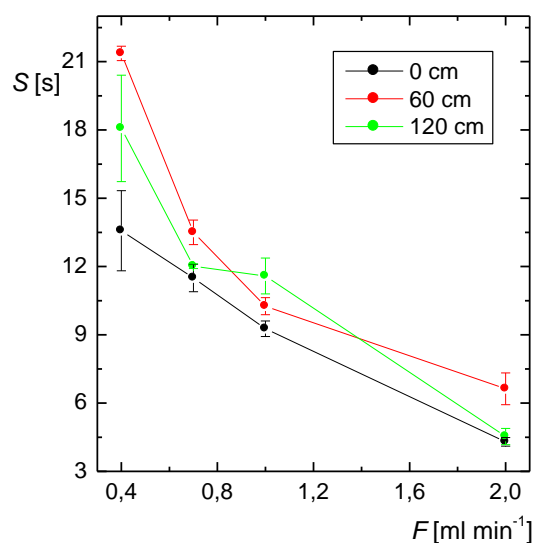
Tab. 3.5 Váhy faktoru w_i pro jednotlivé sledované faktory a jejich kombinace při spektrofotometrickém FIA stanovení vybraných glykosaminoglykanů kationovými barvivy ($c(\text{azur B}) = 1,6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $c(\text{fenosafranin}) = 3,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $c(\text{heparin}) = 0,714 \text{ IU ml}^{-1}$, $c(\text{chondroitin sulfát}) = 9,0 \text{ mg dm}^{-3}$).

glykosaminoglykan	barvivo	w_i						
		A	B	C	AB	AC	BC	ABC
chondroitin sulfát	azur B	-7,021	6,668	1,049	-2,756	-0,485	-0,025	-1,010
heparin	azur B	-7,536	6,266	2,114	-2,951	-1,736	0,723	0,020
heparin	fenosafranin	-5,812	3,278	1,996	-1,323	-0,671	0,899	0,110

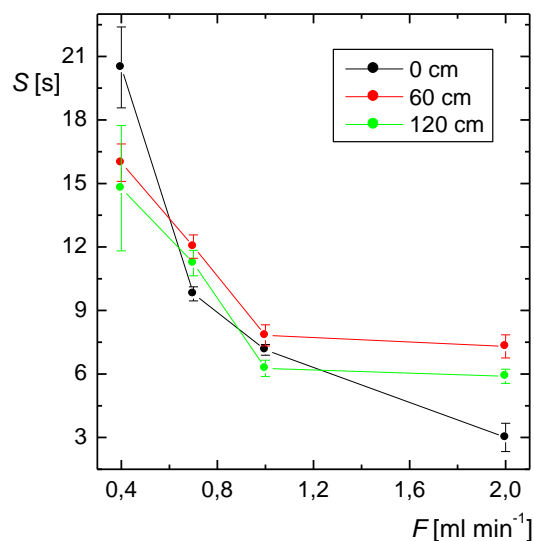
Z výsledků vyplývá, že nejvýznamnějším faktorem u všech tří stanovení je průtoková rychlost (faktor A). Ostatní faktory a jejich vzájemné kombinace byly vyhodnoceny také jako významné. Pro další měření byl dávkovaný objem vzorku 100 μl zvolen jako optimální. Plochy píků získaných při nadávkování nižšího objemu vzorku (50 μl) nebyly dostatečně velké a byla u nich pozorována vyšší směrodatná odchylka. Pro ostatní parametry (průtokovou rychlost a délka reakční cívky) byly změřeny další hodnoty pro lepší stanovení optimálních podmínek měření.

3.2.2 Optimalizace průtokové rychlosti a délky reakční cívky

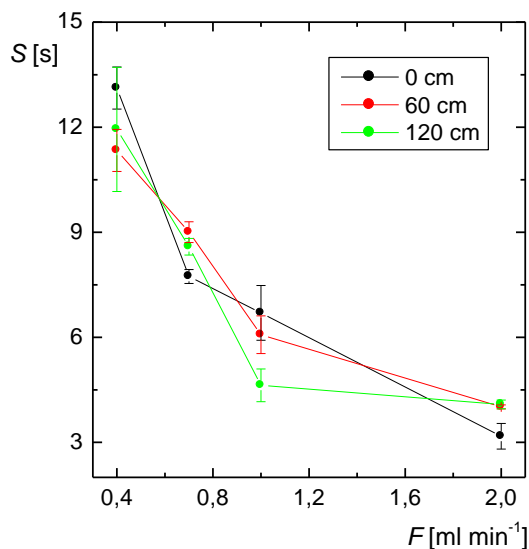
Vliv průtokové rychlosti nosného roztoku byl sledován v rozmezí 0,4 – 2,0 ml min^{-1} . Byly změřeny celkem čtyři rychlosti 0,4; 0,7; 1,0 a 2,0 ml min^{-1} . Všechny rychlosti byly změřeny se třemi různě dlouhými reakčními cívkami. Délky reakčních cívek byly následující 0; 60 a 120 cm. Grafy závislosti ploch píků na průtokové reakční rychlosti nosného proudu jsou zobrazeny na obr. 3.18, 3.19 a 3.20. V každém grafu jsou uvedeny tři křivky, které zobrazují závislost ploch píků na rychlosti nosného proudu pro různou délku reakční cívky.



Obr. 3.18 Závislost plochy piku na průtokové rychlosti nosného roztoku azuru B pro reakci s heparinem. V grafu jsou uvedeny tři závislosti pro tři různé délky reakčních cívek ($\lambda_{\text{ex}} = 621 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 667 \text{ nm}$, $U_{\text{detektoru}} = 1125 \text{ V}$, $c_{\text{azur B}} = 1,6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $c_{\text{Hep}} = 0,357 \text{ IU ml}^{-1}$, $V_{\text{Hep}} = 100 \mu\text{l}$).



Obr. 3.19 Závislost plochy piku na průtokové rychlosti nosného roztoku azuru B pro reakci s chondroitin sulfátem. V grafu jsou uvedeny tři závislosti pro tři různé délky reakčních cívek ($\lambda_{\text{ex}} = 621 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 667 \text{ nm}$, $U_{\text{detektoru}} = 1125 \text{ V}$, $c_{\text{azur B}} = 1,6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $c_{\text{CS}} = 3,792 \text{ mg dm}^{-3}$, $V_{\text{CS}} = 100 \mu\text{l}$).



Obr. 3.20 Závislost plochy píku na průtokové rychlosti nosného roztoku fenosafraninu pro reakci s heparinem. V grafu jsou uvedeny tři závislosti pro tři různé délky reakčních cívek ($\lambda_{\text{ex}} = 469 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 585 \text{ nm}$, $U_{\text{detektoru}} = 850 \text{ V}$, $c_{\text{fenosafranin}} = 3,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $c_{\text{Hep}} = 0,357 \text{ IU ml}^{-1}$, $V_{\text{Hep}} = 100 \text{ }\mu\text{l}$).

Při průtokové rychlosti $0,4 \text{ ml min}^{-1}$ bylo dosaženo největší plochy píku, avšak délka jednoho píku byla příliš velká, přibližně 120 s. Zároveň při takto nízké rychlosti bylo dosaženo velkých směrodatných odchylek. Z těchto důvodů byla jako optimální průtoková rychlost vybrána $0,7 \text{ ml min}^{-1}$, kdy bylo dosaženo dostatečně velké plochy píku a jeho délka byla zhruba o polovinu kratší oproti nejmenší rychlosti (50 s). Při nejvyšší rychlosti byly získány velmi úzké píky, které se obtížně vyhodnocovaly. Optimální délka reakční cívky byla zvolena tak, aby při ní bylo dosaženo největší plochy píku při průtokové rychlosti nosného roztoku $0,7 \text{ ml min}^{-1}$. Z grafů je patrné, že se jedná o délku 60 cm.

3.2.3 Optimální podmínky FIA stanovení

Byly optimalizovány podmínky pro spektrofluorimetrické FIA stanovení vybraných glykosaminoglykanů kationovými barvivy, tak aby bylo dosaženo maximální citlivosti a vzorkovací frekvence. Tyto podmínky jsou uvedeny v tab. 3.6.

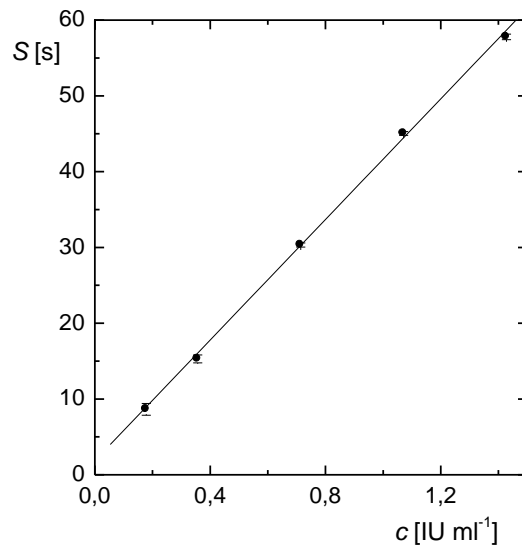
Tab. 3.6 Optimální hodnoty parametrů pro spektrofluorimetrické FIA stanovení vybraných glykosaminoglykanů kationovými barvivy

parametr	hodnota	
	azur b	fenosafranin
excitační vlnová délka	621 nm	469 nm
emisní vlnová délka	667 nm	585 nm
koncentrace barviva	$1,6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$	$3,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$
objem dávkovaného vzorku	100 μl	
průtoková rychlost nosného roztoku	0,7 ml min^{-1}	
délka reakční cívky	60 cm	

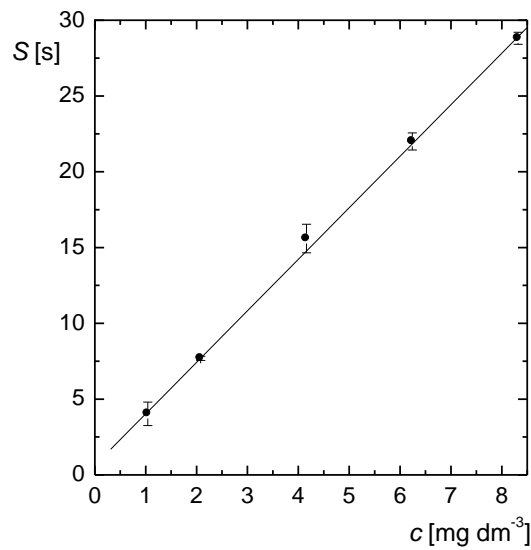
3.2.4 Kalibrační závislosti

Po nastavení optimalizovaných parametrů FIA stanovení byly změřeny kalibrační závislosti. Byly naměřeny závislosti ploch píků na vzrůstající koncentraci glykosaminoglykanu. Pro sestavení kalibrační závislosti byla použita vždy jen lineární část křivky, která byla proložena křivkou lineární regrese. Výsledné kalibrační závislosti jsou zobrazeny na obr. 3.21, 3.22 a 3.23.

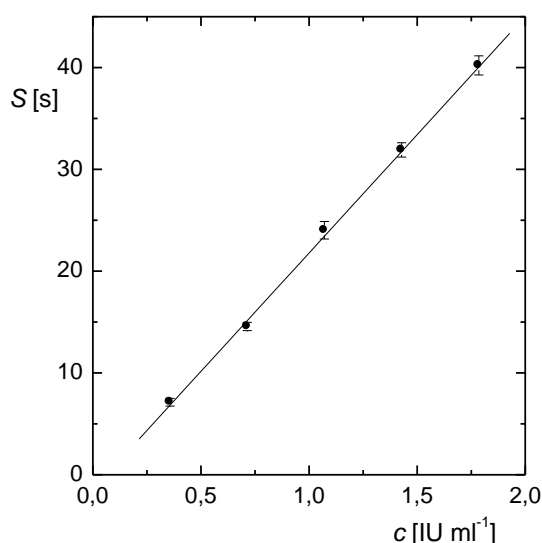
Parametry kalibračních přímek, jejich směrodatné odchylky (s), korelační koeficienty (R) a lineární dynamické rozsahy (LDR) jsou uvedeny v tab. 3.7.



Obr. 3.21 Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci přidaného heparinu (0,18 - 1,43 IU ml⁻¹) při spektrofluorimetrickém FIA stanovení heparinu azurem B ($c = 1,6 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³) ($\lambda_{\text{ex}} = 621$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 667$ nm, $U_{\text{detektoru}} = 1125$ V, $F = 0,7$ ml min⁻¹, $l_{\text{RC}} = 60$ cm, $V_{\text{Hep}} = 100$ μ l).



Obr. 3.22 Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci přidaného chondroitin sulfátu (1,04 - 8,32 mg dm⁻³) při spektrofluorimetrickém FIA stanovení chondroitin sulfátu azurem B ($c = 1,6 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³) ($\lambda_{\text{ex}} = 621$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 667$ nm, $U_{\text{detektoru}} = 1125$ V, $F = 0,7$ ml min⁻¹, $l_{\text{RC}} = 60$ cm, $V_{\text{CS}} = 100$ μ l).



Obr. 3.23 Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci přidaného heparinu ($0,36 - 2,50 \text{ IU ml}^{-1}$) při spektrofluorimetrickém FIA stanovení heparinu fenosafraninem ($c = 3,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) ($\lambda_{\text{ex}} = 469 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 585 \text{ nm}$, $U_{\text{detektoru}} = 850 \text{ V}$, $F = 0,7 \text{ ml min}^{-1}$, $l_{\text{RC}} = 60 \text{ cm}$, $V_{\text{Hep}} = 100 \mu\text{l}$).

Tab. 3.7 Parametry kalibračních přímek ($y = a + bx$) pro FIA stanovení glykosaminoglykanů na základě tvorby iontového asociátu s kationtovým barvivem, korelační koeficienty (R), směrodatné odchylky kalibračních přímek (s) a lineární dynamické rozsahy (LDR).

glykosaminoglykan	barvivo	a	b	R	s	LDR
chondroitin sulfát	azur B	0,6258	$3,3998 \text{ mg}^{-1} \text{ dm}^3$	0,9999	0,5620	$2,37-8,32 \text{ mg dm}^{-3}$
heparin	azur B	1,8632	$39,7864 \text{ IU}^{-1} \text{ ml}$	0,9991	2,1357	$0,19-1,43 \text{ IU ml}^{-1}$
heparin	fenosafranin	-1,4690	$23,2524 \text{ IU}^{-1} \text{ ml}$	0,9992	1,0187	$0,19-1,79 \text{ IU ml}^{-1}$

Z parametrů kalibračních závislostí je patrné, že stanovení heparinu azurem B stejně jako ve statickém uspořádání poskytuje nejstrmější směrnici, stanovení heparinu azurem B je tedy citlivější než stanovení heparinu fenosafraninem. Opakem je tomu v případě opakovatelnosti, kde pro stanovení heparinu fenosafraninem bylo dosaženo lepší opakovatelnosti než azurem B. Hodnoty korelačních koeficientů jsou pro stanovení heparinu srovnatelné. Stejně tak je tomu u použitelných lineárních dynamických rozsahů.

Po proměření kalibračních závislostí byly určeny základní charakteristiky spektrofluorimetrického FIA stanovení glykosaminoglykanů na základě tvorby

iontového asociátu s kationtovým barvivem. Byla vypočtena mez detekce a mez stanovitelnosti (tab. 3.9). Pro stanovení maximální vzorkovací frekvence byl použit FIA pík odpovídající největší koncentraci kalibrační přímky pro jednotlivá stanovení. Maximální vzorkovací frekvence jsou uvedeny v tab. 3.8.

Tab. 3.8 Charakteristiky FIA stanovení glykosaminoglykanů na základě tvorby iontového asociátu s kationtovým barvivem: mez detekce (*LOD*), mez stanovitelnosti (*LOQ*) a maximální frekvence dávkování vzorku (S_{\max}).

glykosaminoglykan	barvivo	<i>LOD</i>	<i>LOQ</i>	S_{\max} h ⁻¹
chondroitin sulfát	azur B	0,58 mg dm ⁻³	2,37 mg dm ⁻³	55
heparin	azur B	0,023 IU ml ⁻¹	0,186 IU ml ⁻¹	46
heparin	fenosafranin	0,102 IU ml ⁻¹	0,192 IU ml ⁻¹	32

Pro azur B bylo dosaženo až o řád nižší meze detekce než pro stanovení heparinu fenosafraninem. Meze stanovitelnosti jsou pro obě barviva srovnatelná.

3.3 APLIKACE FIA STANOVENÍ NA FARMACEUTICKÉ VZORKY

Heparin byl stanoven ve dvou injekčních roztocích heparinu. Pro stanovení obsahu heparinu ve vzorku byla použita metoda kalibrační přímky. Výsledky jsou uvedeny v tab. 3.9. Bylo provedeno celkem šest měření.

Tab. 3.9 Deklarované a stanovené obsahy heparinu v léčivých přípravcích analyzovaných metodou FIA se spektrofluorimetrickou detekcí a relativní směrodatná odchylka stanovení (s_r).

barvivo	léčivý přípravek	obsah [IU ml ⁻¹]		s_r [%]
		deklarovaný	stanovený	
azur B	Heparin Forte Léčiva	25 000	27 000 ± 2 000	5,6
	Heparin Léčiva	5 000	5 100 ± 300	4,4
fenosafranin	Heparin Forte Léčiva	25 000	26 800 ± 700	2,1
	Heparin Léčiva	5 000	5 400 ± 400	5,0

Vyvinuté stanovení heparinu kationovými barvivy průtokovou injekční analýzou s fluorimetrickou detekcí poskytovalo srovnatelné hodnoty obsahů heparinu v injekčních roztocích s deklarovanými hodnotami od výrobce.

Chondroitin sulfát byl stanoven ve dvou potravinových doplňcích. Pro stanovení obsahu chondroitin sulfátu ve vzorku byla použita metoda kalibrační přímky. Výsledky jsou uvedeny v tab. 3.10.

Tab. 3.10 Deklarované a stanovené obsahy chondroitin sulfátu v léčivých přípravcích analyzovaných metodou FIA azurem B se spektrofluorimetrickou detekcí a relativní směrodatná odchylka stanovení (s_r).

léčivý přípravek	obsah		s_r [%]
	deklarovaný	stanovený	
Fexodon	200 mg/tbt.	215 ± 7	2,1
Altermed	50 mg/sáček	53 ± 2	2,8

Stanovení chondroitin sulfátu azurem B průtokovou injekční analýzou s fluorimetrickou detekcí poskytovalo srovnatelné hodnoty obsahů chondroitin sulfátu v potravinových doplňcích s deklarovanými hodnotami od výrobce. U léčivého přípravku Fexodon byla naměřena mírně zvýšená hodnota obsahu chondroitin sulfátu. Tento fakt může být způsoben rozdílnou sulfatací chondroitin sulfátu oproti referenčnímu standardu nebo vlivem matrice.

4 ZÁVĚR

Cílem předkládané diplomové práce bylo navrhnout a optimalizovat metodu pro stanovení vybraných glykosaminoglykanů (heparinu a chondroitin sulfátu) pomocí průtokové injekční analýzy se spektrofluorimetrickou detekcí za využití vybraných kationtových barviv (fenosafraninu a azuru B). Princip stanovení je založen na interakci negativně nabitého heparinu/chondroitin sulfátu s kationtovým barvivem za vzniku iontového asociátu. Vzniklý iontový asociát potlačuje fluorescenci kationového barviva, proto je sledována míra poklesu intenzity fluorescence barviva v jeho emisním maximu.

V prvním kroku této práce byly nalezeny optimální podmínky pro statické uspořádání, jako jsou vlnové délky excitačních a emisních maxim kationových barviv. Dále byl studován vliv pH na pokles intenzity fluorescence barviva při interakci s vybraným glykosaminoglykanem. Bylo zjištěno, že stanovení nelze provádět v přítomnosti pufru, proto byl studován vliv pH na míru poklesu intenzity fluorescence v rozsahu $\text{pH} = 4,5 - 6,5$. Změna pH výrazně neovlivňovala stanovení. Dalším studovaným parametrem byla koncentrace kationových barviv, stechiometrie daných reakcí a nakonec byly změřeny kalibrační závislosti.

Dalším krokem bylo sestrojení průtokové aparatury a nalezení optimálních podmínek. Optimalizovány byly následující parametry: objem dávkovaného vzorku, délka reakční cívky a průtoková rychlost nosného roztoku, kterým bylo vybrané barvivo. Za optimálních podmínek byly proměřeny jednotlivé kalibrační závislosti a základní charakteristiky stanovení. Pro stanovení heparinu azurem B bylo dosaženo větší citlivosti než pro stanovení heparinu fenosafraninem.

Na závěr byla vypracovaná metoda úspěšně aplikována na léčivé přípravky, kde bylo dosaženo dobrých výsledků jak pro stanovení heparinu, tak pro stanovení chondroitin sulfátu.

Literatura

- [1] Mermet, J. M., Otto, M., Kellner, R.: *Analytical Chemistry: A Modern Approach to Analytical Science*. Wiley-VCH 2004.
- [2] Barnett, N. W., Lenehan, C. E., Lewis, S. W.: Sequential injection analysis: An alternative approach to process analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry* 18:5 (1999) 346-353.
- [3] Miro, M., Cerda, V., Estela, J. M.: Multisyringe flow injection analysis: characterization and applications. *Trends in Analytical Chemistry* 21:3 (2002) 199-210.
- [4] Wagner, Ch., Armenta, S., Lendl, B.: Developing automated analytical methods for scientific environments using LabVIEW. *Talanta* 80:3 (2010) 1081-1088.
- [5] Evgen'ev, M. I., Garmonov, S. Yu., Shakirova, L. Sh., Brysaev, A. S.: Flow-injection determination of toxic aromatic amines in medicinal preparations. *Journal of Analytical Chemistry* 57:12 (2002) 1103-1108.
- [6] Egorov, O., Grate, J. W., Ruzicka, J.: Automation of radiochemical analysis by flow injection techniques: Am-Pu separation using TRU-resin sorbent extraction column. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 234:1-2 (1998) 231-235.
- [7] Cerda, V., Estela, J. M., Forteza, R., Cladera, A., Becerra, E., Altimira, P., Sitjar, P.: Flow techniques in water analysis. *Talanta* 50:4 (1999) 695-705.
- [8] Ridder, C., Hansen, E. H., Ruzicka, J.: Flow injection analysis of glucose in human serum by chemiluminescence. *Analytical Letters* 15:B21 (1982) 1751-1766.
- [9] Růžička J., Hansen E. H.: Flow injection analysis. I. New concept of fast continuous flow analysis. *Analytica Chimica Acta* 78:1 (1975) 145-157.
- [10] <http://www.flowinjectiontutorial.com/> (citováno dne 14.7.2014)
- [11] Theodoridis, G. A., Zacharis, C. K., Voulgaropoulos, A. N.: Automated sample treatment by flow techniques prior to liquid-phase separations. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70:2 (2007) 243-252.

- [12] Valeur B.: *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH 2001.
- [13] Gore M. G. (ed.): *Spectrophotometry and Spectrofluorimetry: A Practical Approach*. New York, Oxford University Press 2000.
- [14] <http://www.chemicaland21.com/> (citováno dne 10.7.2014)
- [15] Dave, G. A.; Mehta, R. H., Patel, N. G.: Method for detection of microbial contaminants in plant tissue cell cultures. PCT Int. Appl. (2013) WO 2013164835 A1 20131107.
- [16] Saleh, F. S., Rahman, M. R., Okajima, T., Mao, L., Ohsaka, T.: Determination of formal potential of NADH/NAD⁺ redox couple and catalytic oxidation of NADH using poly(phenosafranin)-modified carbon electrodes. *Bioelectrochemistry* 80:2 (2011) 121-127.
- [17] Saleh, F. S., Okajima, T., Kitamura, F., Mao, L., Ohsaka, T.: Poly(phenosafranin)-functionalized single-walled carbon nanotube as nanocomposite electrocatalysts: Fabrication and electrocatalysis for NADH oxidation. *Electrochimica Acta* 56:13 (2011) 4916-4923.
- [18] Geetha, K.; Balasubramanian, N.: Spectrometric determination of nitrite using phenosafranin. *Chemia Analytica* 46:4 (2001) 579-588.
- [19] Niu, X. L., Sun, W., Jiao, K.: Voltametric determination of hyaluronic acid based on its interaction with phenosafranin. *Russian Journal of Electrochemistry* 45:8 (2009) 902-907.
- [20] Ahmad, A. S.; Abdel Kawy, M.; Nebsen, M. Spectrofluorimetric determination of acrivastine by complexation with phenosafranin dye. *Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences* 39:1-3 (1999) 71-80.
- [21] Zhang, S., Zhao, F., Li, N., Li, K., Tong, S.: Spectroscopic studies on the spontaneous assembly of phenosafranin on glycosaminoglycans templates. *Spectrochimica Acta A* 58:12 (2002) 2613-2619.
- [22] Friedrich, K., Seiffert, W., Zimmermann, H. W.: Romanowsky dyes and Romanowsky-Giemsa effect. 5. Structural investigations of the purple DNA-AB-EY dye complexes of Romanowsky-Giemsa staining. *Histochemistry* 93:3 (1990) 247-56.
- [23] Badiadka, N., Kenchaiah, S.: Facile and sensitive spectrophotometric method for

- the determination of vanadium. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry* 4:2 (2009) 141-151.
- [24] Mathew, M., Narayana, B.: A highly sensitive spectrophotometric method for the determination of trace copper using azure B as a chromogenic reagent. *Journal of Scientific & Industrial Research* 66:1 (2007) 28-31.
- [25] Mathew, M., Narayana, B.: An easy spectrophotometric determination of selenium using azure B as a chromogenic reagent. *Indian Journal of Chemical Technology* 13:5 (2006) 455-458.
- [26] Cherian, T., Narayana, B.: A New spectrophotometric method for the determination of arsenic in environmental and biological samples. *Analytical Letters* 38:13 (2005) 2207-2216.
- [27] Nemcova, I., Rychlovsky, P., Havelcova, M.: Flow-injection analysis based on extraction and spectrophotometric determination of penicillins with thiazine dyes. *Analytical Letters* 42:7 (2009) 989-999.
- [28] Ramappa, P. G., Nayak, A. N.: Rapid spectrophotometric determination of saccharin in soft drinks and pharmaceuticals using Azure B as reagent. *Analyst* 108:1289 (1983) 966-970.
- [29] Higashijima T., Fuchigami T., Imasaka T., Ishibashi N.: Determination of amino acids by capillary zone electrophoresis based on semiconductor laser fluorescence detection. *Analytical Chemistry* 64 (1992) 711 – 714.
- [30] Kong, L., Liu, Z. F., Liu, S. P.: Resonance Rayleigh scattering method for direct determination of polyacrylamide in water samples using basic phenothiazine dyes. *Journal of Analytical Chemistry* 69:2 (2014) 149-156.
- [31] Thiem, J., Fraser-Reid, B. O., Tatsuta, K.: *Glycoscience. Chemistry and Chemical Biology*. Berlin, Springer 2009.
- [32] Koolman, J., Röhm K.-H., *Color Atlas of Biochemistry*. Thieme 2005.
- [33] Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W.: *Harperova Biochemie*. H & H 2002
- [34] Nelson, D. L., Cox, M. M.: *Lehninger Principles of Biochemistry*. Freeman 2005.
- [35] Lüllmann H., Mohr K., Hein L.: *Barevný atlas farmakologie*. Praha, Grada 2007.
- [36] Dumitriu, S. (ed.): *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional*

Versatility. CRC Press 2012.

- [37] Lincová, D., Farghali, H.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha, Galén 2007.
- [38] Marek, J. a kol.: *Farmakoterapie vnitřních nemocí*. Praha, Grada 2010.
- [39] Rabenstein, D. L.: Heparin and heparan sulfate: Structure and function *Natural Product Reports* 19:3 (2002) 312-331.
- [40] Hynie S.: *Farmakologie v kostce*. Praha, Triton 2001.
- [41] *Český lékopis* 2005. Praha, Grada 2005, str. 3554-3556
- [42] Wu, L. P., Huang, Ch. Z., Yang, X., He, J., Li, L. L., Liu, H., Zhao, H. W.: Determination of heparin based on the reaction with Co(II)/5-Cl-PADAB complex using the resonance Rayleigh scattering technology. *Analytical Methods* 5:10 (2013) 2511-2514.
- [43] 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* 449:1-2 (2001) 261-270.
- [44] 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* (2001), 449:1-2 261-270.
- [45] Huang, Ch. Z., Pang, X. B., Li, Y. F.: Determination of heparin using azure B by flow injection analysis-resonance light scattering coupled technique. *Analytical Letters* 38:2 (2005) 317-330.
- [46] Liao, Q. G., Li, W. H., Luo, L. G.: Determination of heparin in plasma by HPLC coupled with resonance light scattering detection. *Chromatographia* 76:23-24 (2013) 1677-1682.
- [47] Tan L., Yao S., Xie Q.: Electrochemical determination of heparin using methylene blue probe and study on competition of Ba²⁺ with methylene blue for binding heparin. *Talanta* 71 (2007) 827 – 832.
- [48] Sun, W., Ding, Y., Wang, Q., Jiao, K.: Electrochemical detection of heparin based on its interaction with light green. *Electroanalysis* 18:11 (2006) 1114-1120.

- [49] Chen, Y., Ding, J., Qin, W.: Polycation-sensitive membrane electrode for determination of heparin based on controlled release of protamine. *Analyst* 137:8 (2012) 1944-1949.
- [50] Li, L., Liang, Y., Liu, Y.: Designing of molecularly imprinted polymer-based potentiometric sensor for the determination of heparin. *Analytical Biochemistry* 434:2 (2013) 242-246.
- [51] Patil S. R., Mote U. S., Kolekar G. B.: Determination of heparin using norfloxacin-cerium complex as a fluorescence probe by spectrofluorimetry. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 30:12 (2009) 3034 – 3038.
- [52] Zhu, X.; Wang, X.; Jiang, Ch.: Spectrofluorimetric determination of heparin using a tetracycline-europium probe. *Analytical Biochemistry* 341:2 (2005) 299-307.
- [53] Egawa Y., Hayashida R., Seki T., Anzai J.: Fluorometric determination of heparin based on self-quenching of fluorescein-labeled protamine. *Talanta* 76:4 (2008) 736 – 741.
- [54] Nemcova, I.; Rychlovsky, P.; Havelcova, M.; Brabcova, M. Determination of heparin using flow injection analysis with spectrophotometric detection. *Analytica Chimica Acta* 401:1-2 (1999) 223-228.
- [55] Dinges, M. M., Solakyildirim, K., Larive, C. K.: Affinity capillary electrophoresis for the determination of binding affinities for low molecular weight heparins and antithrombin-III. *Electrophoresis* 35:10 (2014) 1469-1477.
- [56] Wang, Z., Li, D., Sun, X., Bai, X., Jin, L., Chi, L.: Liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry for compositional analysis of low molecular weight heparins. *Analytical Biochemistry* 451 (2014) 35-41.
- [57] Szekely, J., Collins, M., Currie, C. A.: Alternative method for determination of contaminated heparin using chiral recognition. *Journal of Chromatography B Sciences* 959 (2014) 1-4.
- [58] Li, G., Cai, C., Li, L., Fu, L., Chang, Y., Zhang, F., Toida, T., Xue, Ch., Linhardt, R. J.: Method to detect contaminants in heparin using radical depolymerization and liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 86:1 (2014) 326-330.
- [59] Volpi, N.: Analytical aspects of pharmaceutical grade chondroitin sulfates

- Journal of Pharmaceutical Sciences* 96:12 (2007) 3168-3180.
- [60] Voet, D., Voetová, J. G.: *Biochemie*. Victoria Publishing 1995.
- [61] Smith C. M., Marks, A. D., Lieberman, M. A.: *Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach*. Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
- [62] Sugahara, K., Mikami, T., Uyama, T., Mizuguchi, S., Nomura, K., Kitagawa, H.: Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Current Opinion in Structural Biology* 13:5 (2003) 612-620.
- [63] Henrotin, Y., Mathy, M., Sanchez, Ch., Lambert, C.: Chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis: from in vitro studies to clinical recommendations. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease* 2:6 (2010) 335-348.
- [64] Kahan, A., Uebelhart, D., De Vathaire, F., Delmas, P. D., Reginster, J.-Y.: Long-term effects of chondroitins 4 and 6 sulfate on knee osteoarthritis: the study on osteoarthritis progression prevention, a two-year, randomized, double-blind, placebocontrolled trial. *Arthritis & Rheumatism* 60:2 (2009) 524-533.
- [65] Volpi, N.: Advances in chondroitin sulfate analysis: application in physiological and pathological states of connective tissue and during pharmacological treatment of osteoarthritis. *Current Pharmaceutical Design* 12:5 (2006) 639-658.
- [66] Volpi, N.: Quality of different chondroitin sulfate preparations in relation to their therapeutic activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 61:10 (2009) 1271-1280.
- [67] Campo, G. M., Avenoso, A., Campo, S., Ferlazzo, A. M., Calatroni, A.: Chondroitin Sulphate: Antioxidant properties and beneficial effects. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 6:12 (2006) 1311-1320.
- [68] Volpi, N.: High-performance liquid chromatography and on-line mass spectrometry detection for the analysis of chondroitin sulfates/hyaluronan disaccharides derivatized with 2-aminoacridone. *Analytical Biochemistry* 397:1 (2010) 13-23.
- [69] Nagarajan, P., Dinakaran, S. K., Ghosh, S., Avasarala, H., Nallayya, M., Banji, D.: Method development and validation for glucosamine and chondroitin sulphate in softlet form by RP-HPLC. *Research & Reviews: Journal of Pharmaceutical Analysis* 2:3 (2013) 6-10.

- [70] Karamanos, N. K., Hjerpe, A.: A survey of methodological challenges for glycosaminoglycan/proteoglycan analysis and structural characterization by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 19:15 (1998) 2561-2571.
- [71] Grimshaw, J.: Analysis of glycosaminoglycans and their oligosaccharide fragments by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 18:12-13 (1997) 2408-2414.
- [72] Solakyildirim, K., Zhang, Z., Linhardt, R. J.: Ultraperformance liquid chromatography with electrospray ionization ion trap mass spectrometry for chondroitin disaccharide analysis *Analytical Biochemistry* 397:1 (2010) 24-28.
- [73] Mucci, A., Schenetti, L., Volpi, N.: ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance identification and characterization of components of chondroitin sulfates of various origin. *Carbohydrate Polymers* 41:1 (1999) 37-45.
- [74] Liu, X., Li, L., Zhao, T., Dong, H.: Determination of chondroitin sulfate in tablets by Raman spectroscopy and near-infrared spectroscopy combined with chemometric methods *Analytical Methods* 6:12 (2014) 4219-4227.
- [75] Cui, Z., Hu, X., Liu, S., Liu, Z.: A dual-wavelength overlapping resonance Rayleigh scattering method for the determination of chondroitin sulfate with Nile blue sulfate. *Spectrochimica Acta A* 83:1 (2011) 1-7.
- [76] Pospichal, R.; Nesmerak, K.; Rychlovsky, P.; Nemcova, I.: Determination of chondroitin sulfate by thiazine dyes using flow injection analysis with spectrophotometric detection. *Analytical Letters* 40:6 (2007) 1167-1175.
- [77] Miller, J. N.; Miller, J.C.: *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 6th Ed. Pearson Education 2010.
- [78] Tunbridge L.J.; Lloyd J.V.; Penhall R.K.; Wise A.L.; Maloney T.: Stability of diluted heparin sodium stored in plastic syringes. *Am J Hosp Pharm* 38:7 (1981) 1001-1004.