

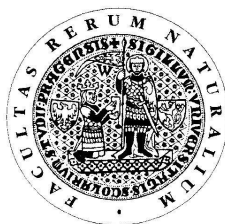
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Ladislav Bár

STANOVENÍ HEPARINU TECHNIKOU SIA  
SE SPEKTROFLUORIMETRICKOU DETEKCÍ

Determination of Heparin using SIA Technique  
with Spectrofluorimetric Detection

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Petr Rychlovský, CSc.

Praha 2011

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

## Prohlášení

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

Jsem si vědom 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 5. května 2011.



.....  
Ladislav Bár

# ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá stanovením heparinu technikou sekvenční injekční analýzy s využitím spektrofluorimetrické a spektrofotometrické detekce. Princip stanovení je založen na interakci heparinu s fenothiazinovým barvivem. Detekuje se pokles intenzity fluorescence barviva v jeho emisním maximu. V případě spektrofotometrické detekce pak pokles absorbance barviva v jeho absorpčním maximu. Z fenothiazinových barviv byla použita methylenová modř, azur A a azur B. Stanovení probíhala na vlastní sestavené SIA aparatuře, pro kterou byl v LabView 7.1 vytvořen ovládací software. Pro spektrofluorimetrickou detekci byly realizovány dvě varianty průtokového uspořádání.

Varianta 1: Pro deionizovanou vodu jako nosný roztok s dávkováním zón barviva a heparinu byly nalezeny tyto optimální podmínky:  $c_{\text{barviva}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $v_{\text{průtoku}} = 2500 \text{ } \mu\text{l min}^{-1}$ ; délka reakční cívky 0 cm; dávkovaný objem barviva 150  $\mu\text{l}$  a vzorku 150  $\mu\text{l}$ . Použitelný dynamický rozsah kalibračních závislostí s exponenciálním průběhem se pro jednotlivá barviva pohybuje v rozmezí m. s. – 1200, případně až 1500 IU  $\text{dm}^{-3}$ . Meze detekce se pohybují v rozsahu 7,6 – 39,1 a meze stanovitelnosti 58,8 – 124,5 IU  $\text{dm}^{-3}$ .

Varianta 2: Při použití barviva jako nosného roztoku s dávkováním heparinu byly zjištěny následující optimální podmínky:  $c_{\text{barviva}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $v_{\text{průtoku}} = 3000 \text{ } \mu\text{l min}^{-1}$ ; délka reakční cívky 50 cm; dávkovaný objem vzorku 100  $\mu\text{l}$ . Použitelný dynamický rozsah kalibračních závislostí je obdobný jako pro první variantu. Meze detekce se pohybují v rozmezí 20,4 – 62,8 a meze stanovitelnosti v rozsahu 80,1 – 135,8 IU  $\text{dm}^{-3}$ .

## Klíčová slova

Heparin

Sekvenční injekční analýza (SIA)

Fenothiazinová barviva

Spektrofluorimetrická detekce

Spektrofotometrická detekce

# ABSTRACT

This thesis was focused on a determination of heparin using sequential injection analysis with spectrofluorimetric and spectrophotometric detection. The principle of determination was based on the interaction of heparin with phenothiazine dye. A decrease of fluorescence intensity of dye in its emission maximum was detected. In the case of spectrophotometric detection a decrease of the absorbance of dye was measured. Azure A, azure B and methylene blue were used as representative selection of phenothiazine dyes. The determination was performed on a laboratory made SIA apparatus, for which a control software in LabVIEW 7.1 graphical programming was created. Two types of flow configuration for spectrofluorimetric detection were implemented.

Type 1: For deionized water as a carrier stream with a injection of heparin and dye zones there were found the following optimal conditions:  $c_{\text{dye}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $v_{\text{flow}} = 2500 \text{ } \mu\text{l min}^{-1}$ ; reaction coil length of 0 cm; injected volume of dye 150  $\mu\text{l}$  and injected volume of sample 150  $\mu\text{l}$ . Dynamic range of calibration curves with an exponential course for the individual dyes in the range of LOQ – 1200, eventually up 1500 IU  $\text{dm}^{-3}$  were detected. Limits of detection between 7.6 – 39.1 and the limits of quantification between 58.8 – 124.5 IU  $\text{dm}^{-3}$  were found.

Type 2: For use a dye as a carrier stream with an injection of heparin there were found the following optimal conditions:  $c_{\text{dye}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $v_{\text{flow}} = 3000 \text{ } \mu\text{l min}^{-1}$ ; reaction coil length of 50 cm; injected volume of sample 150  $\mu\text{l}$ . Dynamic range of calibration curves is similar to the first type of measurement. Limits of detection between 20.4 – 62.8 and the limits of quantification between 80.1 – 135.8 IU  $\text{dm}^{-3}$  were found.

## Keywords

Heparin

Sequential injection analysis (SIA)

Phenothiazine dyes

Spectrofluorimetric detection

Spectrophotometric detection

Na úvod bych rád poděkoval vedoucímu své diplomové práce panu doc. RNDr. Petru Rychlovskému, CSc. za kvalitní vedení, zájem, připomínky a rady, které mi po celou dobu řešení mé diplomové práce poskytoval.

# SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

<b>CFA</b>	kontinuální průtoková analýza
<b>SFA</b>	segmentová průtoková analýza
<b>FIA</b>	průtoková injekční analýza
<b>SIA</b>	sekvenční injekční analýza
<b>LOV</b>	lab-on-valve
<b>BI</b>	bead injection
<b>UV-VIS</b>	ultrafialová a viditelná oblast spektra
<b>IU</b>	International Unit (mezinárodní jednotka) - udává aktivitu heparinu
<b>m. s.</b>	mez stanovitelnosti
<b><math>\Phi_F</math></b>	fluorescenční zářivý tok
<b><math>\Delta\Phi_F</math></b>	rozdíl intenzity fluorescence
<b><math>c</math></b>	koncentrace [ $\text{mol dm}^{-3}$ ], [ $\text{IU dm}^{-3}$ ]
<b><math>U</math></b>	napětí [V]
<b><math>M</math></b>	molarita [ $\text{mol dm}^{-3}$ ]
<b><math>Mr</math></b>	relativní molekulová hmotnost
<b><math>\lambda_{\text{ex}}</math></b>	vlnová délka excitace [nm]
<b><math>\lambda_{\text{em}}</math></b>	vlnová délka emise [nm]
<b>aA</b>	azur A
<b>aB</b>	azur B
<b>mM</b>	methylenová modř
<b>MC</b>	mísící cívka
<b>RC</b>	reakční cívka

# OBSAH

<b>1. CÍL PRÁCE .....</b>	<b>- 9 -</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>- 10 -</b>
2.1. PRŮTOKOVÉ METODY .....	- 10 -
2.1.1. Segmentová průtoková analýza – SFA .....	- 11 -
2.1.2. Průtoková injekční analýza – FIA .....	- 11 -
2.1.3. Sekvenční injekční analýza – SIA .....	- 12 -
2.1.4. Sekvenční injekce v Lab-on-valve formátu – $\mu$ SI-LOV .....	- 15 -
2.2. HEPARIN, JEHO CHARAKTERISTIKY A STANOVENÍ .....	- 18 -
2.3. FENOTHIAZIN A JEHO DERIVÁTY .....	- 19 -
2.3.1. Methylenová modř .....	- 21 -
2.3.2. Azur A .....	- 21 -
2.3.3. Azur B .....	- 22 -
2.4. STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ MĚŘENÍ .....	- 23 -
2.4.1. Bodové odhady .....	- 23 -
2.4.1.1. <i>Aritmetický průměr</i> .....	- 23 -
2.4.1.2. <i>Medián</i> .....	- 23 -
2.4.1.3. <i>Směrodatná odchylka</i> .....	- 23 -
2.4.1.4. <i>Relativní směrodatná odchylka</i> .....	- 24 -
2.4.2. Deanův a Dixonův test .....	- 24 -
2.4.3. Mez detekce a mez stanovitelnosti .....	- 24 -
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>- 25 -</b>
3.1. PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A INSTRUMENTACE .....	- 25 -
3.2. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....	- 25 -
3.3. APARATURA POUŽITÁ PRO SIA STANOVENÍ HEPARINU .....	- 27 -
3.3.1. Spektrofluorimetrická detekce – nosný roztok voda .....	- 27 -
3.3.1.1. <i>Mísící a reakční cívky</i> .....	- 28 -
3.3.2. Spektrofluorimetrická detekce – nosný roztok barvivo .....	- 29 -
3.3.3. Spektrofotometrická detekce .....	- 29 -
3.4. OVLÁDACÍ SOFTWARE .....	- 31 -

<b>4. VÝSLEDKY MĚŘENÍ A DISKUSE</b> .....	<b>- 34 -</b>
4.1. STATICKÁ MĚŘENÍ .....	- 34 -
4.1.1. Excitační spektra fenothiazinových barviv .....	- 34 -
4.1.2. Emisní spektra fenothiazinových barviv .....	- 35 -
4.1.3. Vliv pH na spektrofluorimetrické stanovení heparinu .....	- 37 -
4.1.4. Statické kalibrační závislosti spektrofluorimetrického stanovení heparinu .....	- 38 -
4.2. SPEKTROFLUORIMETRICKÉ SIA STANOVENÍ HEPARINU, NOSNÝ ROZTOK VODA.....	- 40 -
4.2.1. Optimalizace spektrofluorimetrického stanovení heparinu.....	- 40 -
4.2.1.1. Vliv průtokové rychlosti.....	- 42 -
4.2.1.2. Vliv délky (objemu) reakční cívky.....	- 44 -
4.2.1.3. Vliv dávkovaného objemu fenothiazinového barviva a vzorku.....	- 46 -
4.2.1.4. Vliv koncentrace fenothiazinového barviva.....	- 48 -
4.2.1.5. Optimální podmínky stanovení heparinu – nosný roztok voda.....	- 50 -
4.2.2. Kalibrační závislosti heparinu – nosný roztok voda .....	- 51 -
4.2.3. Charakteristiky SIA stanovení heparinu .....	- 54 -
4.2.4. Stanovení vzorku práškového heparinu .....	- 55 -
4.3. SPEKTROFLUORIMETRICKÉ SIA STANOVENÍ HEPARINU, NOSNÝ ROZTOK BARVIVO .....	- 56 -
4.3.1. Optimalizace spektrofluorimetrického stanovení heparinu.....	- 57 -
4.3.1.1. Vliv dávkovaného objemu vzorku .....	- 57 -
4.3.1.2. Vliv délky (objemu) reakční cívky.....	- 58 -
4.3.1.3. Vliv průtokové rychlosti.....	- 59 -
4.3.1.4. Vliv koncentrace fenothiazinového barviva.....	- 61 -
4.3.1.5. Optimální podmínky stanovení heparinu – nosný roztok barvivo .....	- 62 -
4.3.2. Kalibrační závislosti – nosný roztok barvivo .....	- 63 -
4.3.3. Charakteristiky SIA stanovení heparinu .....	- 66 -
4.3.4. Stanovení vzorku práškového heparinu .....	- 67 -
4.4. POROVNÁNÍ PRŮTOKOVÝCH STANOVENÍ HEPARINU .....	- 68 -
4.5. SPEKTROFOTOMETRICKÉ SIA STANOVENÍ HEPARINU.....	- 69 -
<b>5. ZÁVĚR</b> .....	<b>- 70 -</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>- 72 -</b>



# 1. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo vypracovat metodu stanovení heparinu technikou sekvenční injekční analýzy za využití reakce s fenothiazinovými barvivy. Heparin byl již takto stanoven technikou průtokové injekční analýzy<sup>1</sup> se spektrofotometrickou detekcí. Náplní předkládané práce bylo proto vyzkoušet detekci spektrofluorimetrickou a pro porovnání též detekci spektrofotometrickou s využitím spektrometru s optickými vlákny a externím zdrojem záření.

Prvním úkolem diplomové práce byl návrh a sestavení SIA aparatury s následnou tvorbou ovládacího software pro řízení celého procesu analýzy od nadávkování vzorku až po registraci signálu. Dále bylo zapotřebí nalézt optimální podmínky jednotlivých variant průtokového stanovení a posoudit, které z použitých fenothiazinových barviv je pro stanovení heparinu nejvhodnější. Posledním úkolem práce byla aplikace stanovení na reálný vzorek práškového heparinu.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Průtokové metody

Metody průtokové analýzy patří do skupiny instrumentálních technik v analytické chemii. Společným znakem všech průtokových technik je reakce mezi analytem obsaženým v roztoku a vhodným reakčním činidlem v proudu nosné kapaliny, který je realizován pomocí pístového či peristaltického čerpadla. Postupným unášením reakčních zón dochází k jejich promísení a postupné tvorbě reakčního produktu. Ten je dopraven do průtokové cely detekčního systému, kde jeho signál nabývá tvaru píku.

Oproti klasickým analytickým postupům přinášejí průtokové metody řadu praktických výhod. Patří mezi ně např. vyšší rychlosti stanovení, díky čemuž je možné analyzovat velké série vzorků v krátkém čase. Z důvodu malých až zcela miniaturních rozměrů průtokových systémů dochází k výrazně nižším spotřebám vzorků a reakčních činidel. Objemy vznikajícího odpadu jsou tak velmi malé a pohybují se v řádech desítek mililitrů za celý pracovní den. Tím se průtokové metody stávají šetrnými k životnímu prostředí a v případě drahých činidel také ekonomičtější na provoz. Jejich nespornou výhodou je možnost pracovat s původními vzorky, které jsou následně upravovány až přímo v uzavřeném průtokovém systému, který eliminuje kontakt pracovníků s toxickými látkami, jedy a rozpouštědly. Hlavní nevýhodou tradičních průtokových metod je jejich malá flexibilita.

První průtokové systémy, jako např. segmentová průtoková analýza (SFA) či průtoková injekční analýza (FIA), byly ovládané výhradně ručně. Rozvoj počítačů v posledních desetiletích však umožnil vznik automatizovaných technik, mezi které patří sekvenční injekční analýza (SIA) a multisyringe injekční analýza (MSFIA). Tyto počítačem řízené techniky přinesly mnoho výhod a nové možnosti např. v podobě čištění vzorku, jeho zakoncentrování, fotooxidaci nebo odstranění plynů. Další miniaturizace koncepce SIA dala vzniknout technice Lab-On-Valve (SI-LOV). Spojením výše uvedených průtokových technik se separačními metodami vznikly systémy, kam patří Lab-On-Valve-HPLC (LOV-HPLC), sekvenční injekční chromatografie (SIC), multisyringe chromatografie (MSC) a multisyringe kapilární elektroforéza (MSCE)<sup>2</sup>.

Stále narůstající potenciál metod průtokové analýzy je uplatňován všude tam, kde je nutné provádět automatizované analýzy velkých sérií vzorků. Tedy např. v lékařství, farmacii či environmentální analýze.

### **2.1.1. Segmentová průtoková analýza – SFA**

Jednou z prvních prakticky uplatněných průtokových metod se ve druhé polovině padesátých let stala segmentová průtoková analýza (SFA – Segmented Flow Analysis)<sup>3</sup>, která vznikla zdokonalením kontinuální průtokové analýzy (CFA). Zpočátku byla tato metoda ochotně přijata v přetížených klinických laboratořích a později i v laboratořích životního prostředí, zemědělských, oceánografických či průmyslových<sup>4</sup>.

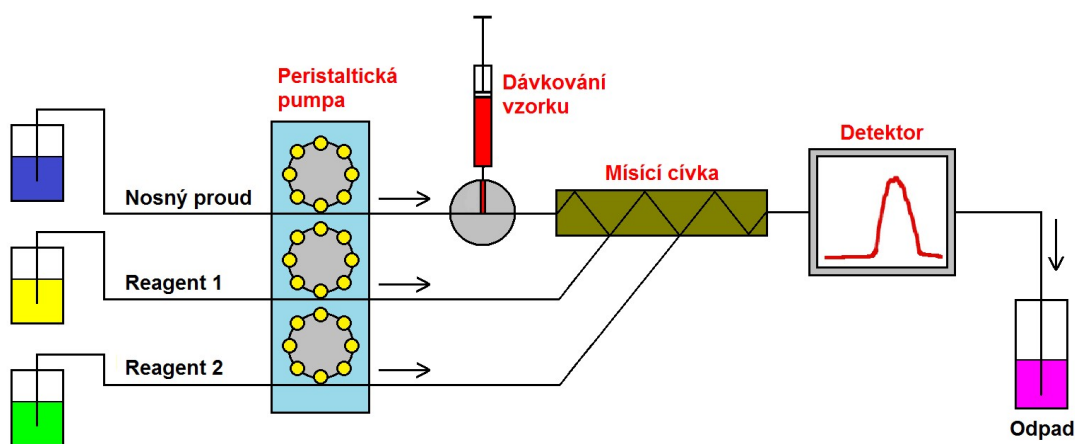
Princip této průtokové techniky je založen na kontinuálním čerpání vzorků, jejichž jednotlivé zóny jsou od sebe odděleny vzduchovými bublinkami, do proudu reakčního činidla. Segmentorem vháněné vzduchové bubliny se snaží zamezovat vzájemné kontaminaci vzorků a současně podporují turbulentní proudění, které má za následek rychlejší promísení jednotlivých zón. Z průtokového systému jsou pomocí debubleru odstraněny dříve, než se dostanou do průtokové cely detektoru<sup>5</sup>.

Přítomnost vzduchovým bublin u SFA způsobuje, díky stlačitelnosti plynné fáze, určitou míru pulzace toku ovlivňující výsledný profil signálu. Další nevýhodou je obtížná kontrola průtokové rychlosti, nutnost udržovat konstantní velikost bublin a složitost systému, která brání jeho miniaturizaci<sup>6</sup>.

### **2.1.2. Průtoková injekční analýza – FIA**

Nevýhody metody SFA daly vzniknout tzv. nesegmentovým průtokovým technikám. První z nich byla průtoková injekční analýza (FIA – Flow Injection Analysis)<sup>7</sup>, navržená v roce 1975 J. Růžičkou a E. Hansenem.

Koncepce metody spočívá v postupném dávkování, vždy přesně definovaných objemů, vzorků do kontinuálního proudu nosné kapaliny (činidlo, pufr), který je realizován peristaltickou pumpou. Nadávkovaná zóna vzorku je v nosném proudu činidla rozmývána a dochází ke vzniku reakčního produktu. Ten je následně dopraven do průtokové cely detektoru a poté putuje do odpadu. Základní schéma aparatury pro průtokovou injekční analýzu je znázorněno na obrázku 1. Výsledkem analýz jsou za sebou jdoucí píky, jejichž výška je mírou koncentrace analytu. Je-li potřeba vzorek smísit s větším počtem reakčních činidel, jsou do hlavního proudu postupně napojovány kanálky dalších reagentů<sup>8</sup>. V klasické FIA technice byl vzorek dávkován ručně napíchnutím septa injekční stříkačkou. Dnes se spíše využívá automatizovaného dávkování prostřednictvím otočení dávkovacího ventilu<sup>5</sup>.



**Obr. 1:** Schéma aparatury pro průtokovou injekční analýzu

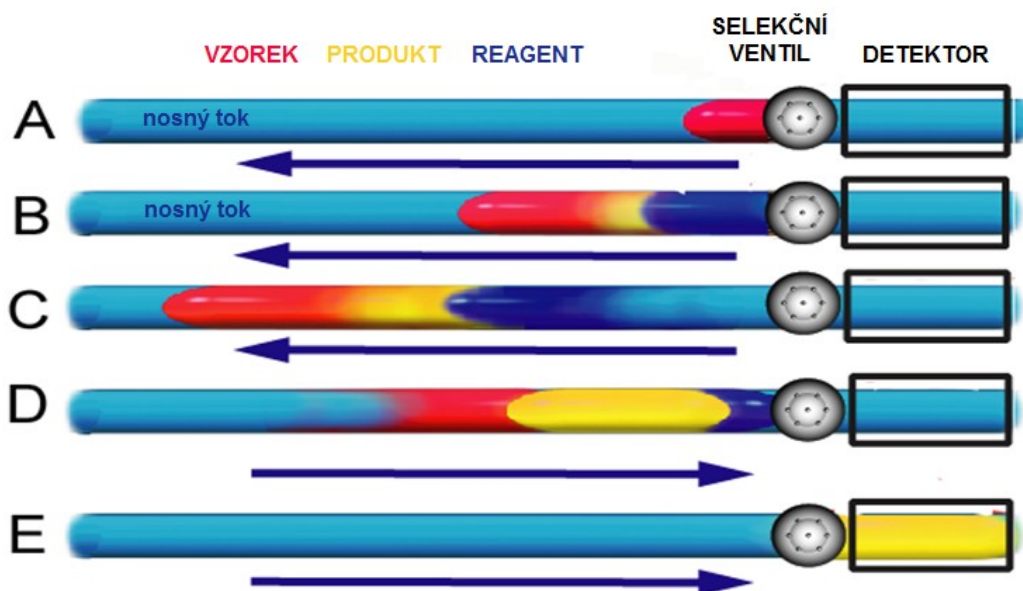
Výhodou FIA je, že na rozdíl od SFA již nedochází k vzduchovému segmentování reakčních zón, dávkované objemy vzorků jsou menší a počty analýz dosažených za jednotku času naopak větší. Používané hadičky mají menší průměr, což má za následek laminární proudění toku. Nevýhody FIA technik spočívají v použití peristaltických pump, které jednak způsobují určitou míru pulzace toku a jednak postupem času deformují tygonové hadičky, čímž dochází ke změnám průtokových parametrů. Tygonové hadičky jsou dále nevhodné pro čerpání agresivních reakčních činidel, kterými jsou zejména organická rozpouštědla<sup>4</sup>.

Pro svou jednoduchost, spolehlivost, robustnost a reprodukovatelnost získaných výsledků se průtoková injekční analýza stala velmi účinnou instrumentální metodou pro široké spektrum analytických aplikací<sup>9</sup>.

### 2.1.3. Sekvenční injekční analýza – SIA

Během odstraňování nevýhod a nedokonalostí techniky FIA<sup>10</sup> byla na počátku devadesátých let vyvinuta sekvenční injekční analýza (SIA – Sequential Injection Analysis)<sup>11</sup>, označovaná za druhou generaci FIA technik. U jejího zrodu stál opět Jaromír Růžička z Washingtonské univerzity. Původně byla navržena pouze jako možná alternativa k metodě FIA, ale v praxi se ukázalo, že nabízí velmi odlišné možnosti použití s množstvím výhod i nevýhod<sup>5</sup>.

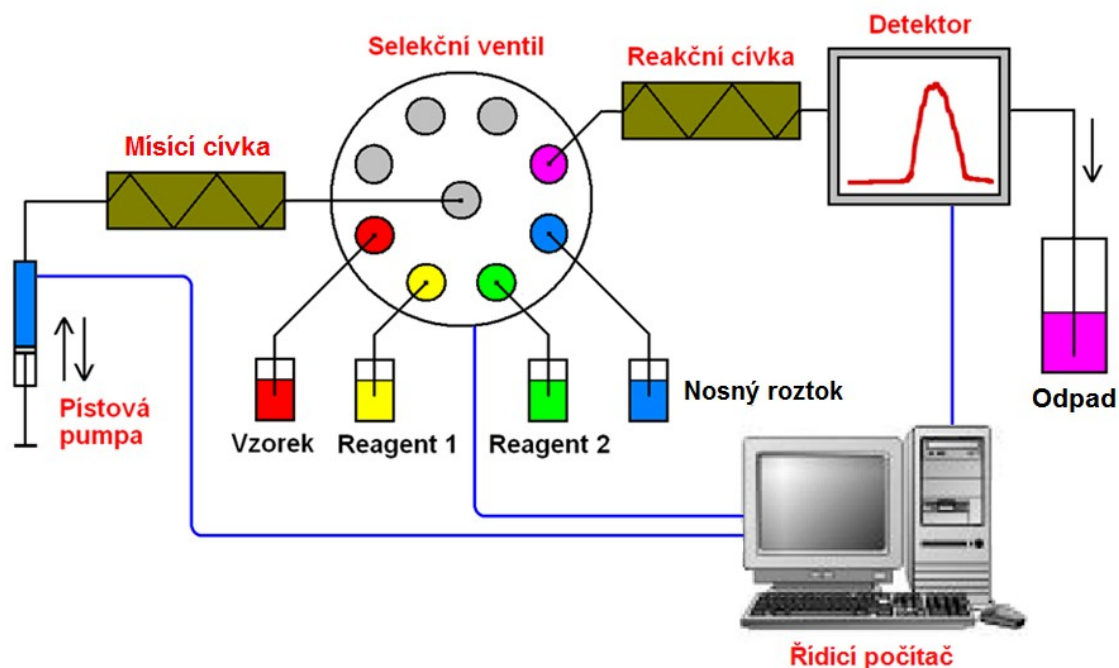
Hlavní odlišnost obou technik spočívá především v geometrii nosného toku. Základem průtokové injekční analýzy je pouze přímý kontinuální tok, zatímco sekvenční injekční analýza využívá programovatelnou kombinaci změn přímého a zpětného směru nosného toku (obr. 2), který je přesně řízený pomocí počítače<sup>12, 13</sup>.



**Obr. 2:** Princip změny směru toku při sekvenční injekční analýze<sup>13</sup>

V nejjednodušším uspořádání jsou postupně přes vícecestný selekční ventil do zpětně se pohybujícího proudu nosného roztoku, realizovaného pístovým čerpadlem s injekční stříkačkou, postupně dávkovány zóny vzorku (A, červená) a reakčního činidla (B, modrá). Pohybující se nadávkované zóny se postupně rozmývají a na jejich rozhraní začíná vznikat reakční produkt (C, žlutá). Následně dojde k obrácení směru nosného toku (D, E), které dále podpoří promísení reakčních zón a produkt reakce je dopraven do průtokové cely detektoru, čímž je proces analýzy ukončen. Díky počítačovému řízení celého procesu je časový interval od nadávkování vzorku (A) až po detekci reakčního produktu (E) dokonale reprodukovatelný a všechny vzorky jsou zpracovány vždy přesně stejným způsobem<sup>13</sup>.

Základní konfigurace systému pro sekvenční injekční analýzu, schématicky znázorněná na obrázku 3, je obvykle tvořena jednokanálovým dvousměrným pístovým čerpadlem s injekční stříkačkou, vícecestným selekčním ventilem (nejčastěji 6, 8 a 10cestným), propojovacími teflonovými kapilárami, které tvoří průtokový systém. Dále pak mísící a případně reakční cívkou, vhodným detektorem s průtokovou detekční celou a řídicím počítačem<sup>12</sup>.



**Obr. 3:** Schéma základní aparatury pro sekvenční injekční analýzu

Pístové čerpadlo, definující tok nosného proudu směrem pohybu pístu injekční stříkačky, je přes mísicí cívku připojeno k centrální pozici selekčního ventilu. Na jeho dalších pozicích jsou připojeny zásobníky nosného roztoku, reagentů, vzorků a také detekční systém, kterému může být u pomaleji probíhajících reakcí předřazena reakční cívka. Přepínáním selekčního ventilu do příslušných pozic jsou do mísicí cívky dávkovány reakční zóny, jejichž objem je přesně určen pomocí doby pohybu pístu injekční stříkačky. Obsah mísicí cívky, která zároveň slouží jako pojistka proti kontaminaci nosného roztoku v prostoru injekční stříkačky, je po obrácení směru nosného toku skrz selekční ventil dopraven do detektoru, kde dochází k monitorování koncentračního gradientu vzniklého reakčního produktu. Jednotlivé části aparatury jsou připojeny k řídicímu počítači s příslušným softwarovým vybavením, který ovládá kroky celého procesu analýzy a současně sbírá, případně vyhodnocuje výstupní data.

Detektory nejsou v SIA nijak systémově omezeny a jejich volba záleží pouze na typu použité chemické reakce. Nejčastěji bývají využívány detektory spektrofotometrické<sup>14</sup>, spektrofluorimetrické<sup>15</sup> a elektrochemické<sup>16</sup>. Detekovaný signál má podobně jako v případě FIA tvar píku<sup>12</sup>.

Ve srovnání s průtokovou injekční analýzou jsou u obou technik používány přibližně stejné průtokové rychlosti pohybující se v řádech jednotek  $\text{ml min}^{-1}$ . Dávkovaný objem vzorku lze u SIA cíleně měnit pro každou analýzu, zatímco u FIA zůstává objem

vzorku konstantní pro celou sérii analýz<sup>12</sup>. Nevýhody SIA spočívají oproti FIA především v nižší frekvenci analýz a v nutnosti používat počítačovou techniku a složitější vybavení<sup>17</sup>. Hlavní výhodou SIA je její flexibilita, založená na programovatelném toku. V jedné konfiguraci je možné provádět celou řadu analytických stanovení, neboť veškeré experimentální parametry (použitá činidla, jejich objemy a reakční časy) lze snadno upravovat prostřednictvím klávesnice počítače, aniž by bylo zapotřebí měnit fyzické uspořádání SIA systému<sup>13</sup>. Další výhodou této techniky je její robustnost, spolehlivost a na rozdíl od FIA pouze jednokanálové uspořádání průtokového systému s jedním ventilem a jedním čerpadlem. Spotřeby reakčních činidel a vzorků jsou díky kombinaci změn směru toku podstatně menší než u FIA, kde je čerpání kontinuální<sup>12</sup>.

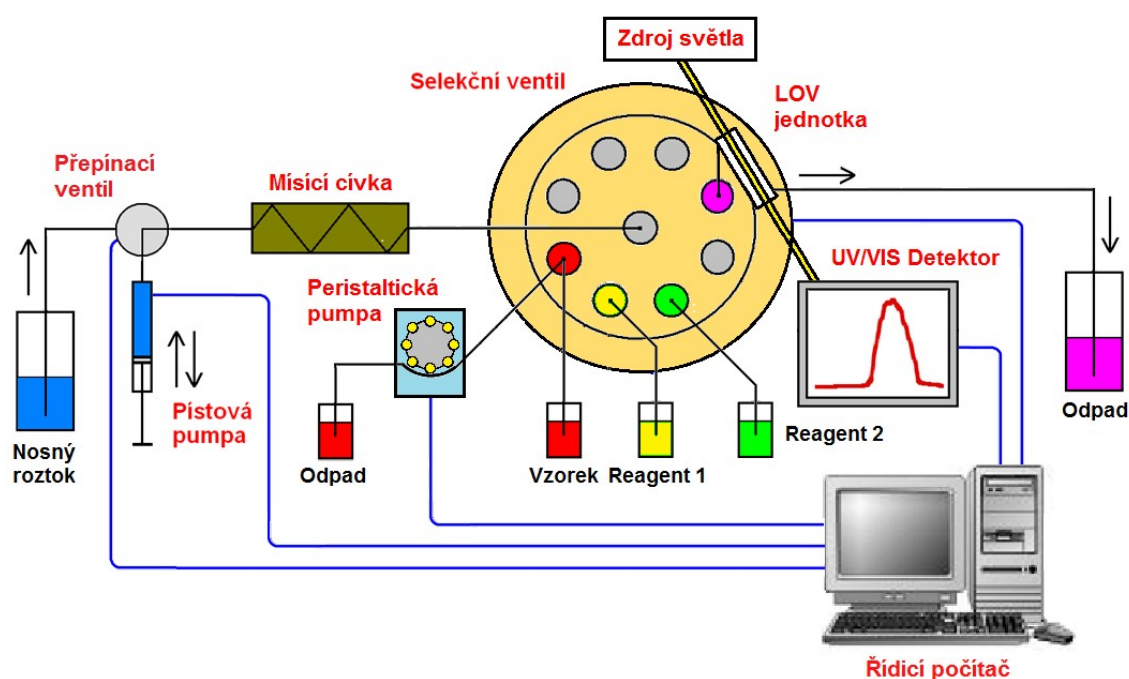
Výše popsaný klasický model SIA našel široké uplatnění v průmyslových, environmentálních, potravinářských, imunologických, biologických a farmaceutických analýzách. To ve svém rozsáhlém review z roku 2002 dokládá Barnet<sup>18</sup> na 300 pracích. Použitelností SIA v analýze potravin se zabývá review od Pérez-Olmos<sup>19</sup> (rok 2005), kde je popsáno více než 100 prací. Na aplikace SIA pro potřeby farmaceutické analýzy se dále soustřeďuje review, které publikoval Pimenta<sup>20</sup> (rok 2006), obsahující přes 150 prací. Review od Mesquita<sup>15</sup> (rok 2009) podrobně mapuje velké množství prací poukazujících na využití technik sekvenční injekce v analýzách vod. Využití SIA jako účinného nástroje pro nejruznější předúpravy vzorků v on-line uspořádání před vlastní analýzou je shrnuto v review od Economou<sup>21</sup> (rok 2005), které podává výčet téměř 40 prací.

#### **2.1.4. Sekvenční injekce v Lab-on-valve formátu – $\mu$ SI-LOV**

V posledních letech se do popředí zájmu dostává technika mikrosekvenční injekční analýzy v uspořádání lab-on-valve ( $\mu$ SI-LOV)<sup>22</sup>, jenž je popisována jako univerzální mikro-průtokový analyzátor založený na principu sekvenční injekční analýzy<sup>15</sup>. Technika  $\mu$ SI-LOV, považovaná za třetí generaci průtokové injekční analýzy<sup>23</sup>, vznikla s cílem klasický koncept SIA dále miniaturizovat a začlenit do něj všechny nezbytné prvky s možnostmi využití pro nejruznější analytické aplikace<sup>24</sup>.

Miniaturizace bylo dosaženo začleněním víceúčelové průtokové detekční mikrocely s optickými vlákny do kompaktní struktury umístěné na selekční ventil (odtud název lab-on-valve, laboratoř na ventilu)<sup>24</sup>. Optická vlákna jsou na jedné straně připojena k externímu zdroji světla a na druhé k detekčnímu zařízení, což umožňuje sledovat reakce probíhající uvnitř cely v reálném čase<sup>25</sup>. Uspořádáním optických vláken lze detekční celu konfigurovat<sup>22</sup> pro měření absorbance (vlákna jsou proti sobě), fluorescence (úhel vláken

90°) nebo absorbance a fluorescence zároveň (přidáním třetího vlákna). Tzv. LOV jednotka, vyráběná z perspexu, dále obsahuje kanálky pro manipulaci se všemi reakčními činidly a vzorky, které se do průtokového systému dávkuje přímo, sepnutím peristaltické pumpy. Typické uspořádání aparatury pro  $\mu$ SI-LOV je schematicky znázorněno na obrázku 4. Umístění detekční cely na selekční ventil má za následek značné zkrácení analytické cesty a spotřeby reakčních činidel a vzorků jsou díky práci s mikrolitrovými objemy významně nižší, než u klasické SIA<sup>15</sup>. To dělá z techniky SI-LOV ideální nástroj pro biochemická<sup>25, 26</sup> stanovení s možností využití kuličkové injekce (BI – Bead Injection).



**Obr. 4:** Schématické znázornění aparatury pro techniku  $\mu$ SI-LOV

Při spojení technik SI-LOV a bead injection ( $\mu$ SI-BI-LOV systém) je suspenze vhodných kuliček, jejichž zásobárna je umístěna na pozici selekčního ventilu, injektována do průtokové detekční mikrocely, kde dojde k jejich zachycení. Ty pak poskytují pevný povrch využitelný pro chemickou reakci analytu. Na jejich povrch je možné navázat reakční činidla nebo přímo slouží jako jejich náhrada. Pomalým promýváním analytu přes sloupec kuliček v detekční cele s optickým vláknem se monitoruje barevná změna při vzniku reakčního produktu. Detekční cela bývá konstruována jako tzv. „jet-ring-cela“ s principem obnovitelného povrchu, kdy pro každou analýzu jsou použity vždy zcela nové kuličky<sup>23</sup>. Technika je využívána převážně v imunoanalytických a buněčných stanoveních, kdy jsou na povrchu kuliček nanášeny protilátky<sup>15</sup>.



**Tab. 1:** Srovnání výše uvedených průtokových metod včetně hodnot obvyklých parametrů

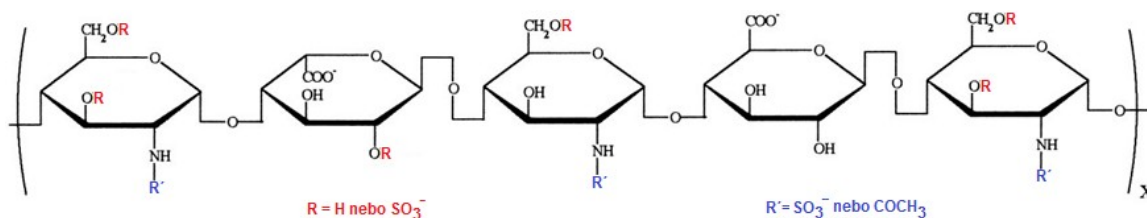
parametr	CFA	FIA	SIA	μSI-LOV
objem vzorku	200 – 2000 μl	50 – 500 μl	50 – 200 μl	10 – 30 μl
dávkování vzorku	kontinuální čerpání	ruční/auto. vstříknutí	automatická injekce	automatická injekce
průměr vedení	1 – 2 mm	0,8 mm	0,5 – 0,8 mm	0,5 – 0,8 mm
průtoková rychlost	< 1 ml min <sup>-1</sup>	0,5 – 1,0 ml min <sup>-1</sup> kanál <sup>-1</sup>	řádově ml min <sup>-1</sup>	1 ml min <sup>-1</sup>
segmentace vzduchem	ANO	NE	NE	NE
počet analýz za hodinu	< 80	< 120	< 60	< 60
spotřeba činidel	vysoká	nízká	až 10x menší oproti FIA	minimální
geometrie toku	pouze přímý	pouze přímý	programovatelná kombinace změn	programovatelná kombinace změn
čerpání činidel	kontinuální	kontinuální	přerušované	přerušované
detekce	v rovnovážném stavu		v konstantním čase	
uspořádání		jedno i vícekanálové		pouze jednobanálové

## 2.2. Heparin, jeho charakteristiky a stanovení

Heparin (CAS: 9041-08-1) je sodná sůl heteropolysacharidů obsahující glukosamin-N-sulfát a uronové kyseliny s proměnlivým zastoupením acetátových a sulfátových funkčních skupin (obr. 5). Jeho úplnou hydrolyzou dochází k uvolnění D-glukosaminu, kyseliny D-glukuronové, kyseliny L-iduronové, kyseliny octové a sírové<sup>27</sup>. Relativní molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 12 000 – 15 000.

Heparin se získává z plic hovězího dobytka nebo ze střevních sliznic hovězího dobytka, prasat či ovcí<sup>27</sup>. Ve značném množství je přítomen také v játrech<sup>28</sup>. Jedná se o přirozenou látku zpomalující krevní srážlivost, kdy blokuje několik stupňů procesu srážení krve a zároveň ovlivňuje funkci krevních destiček<sup>27</sup>. Heparin a jeho deriváty jsou proto účinné při prevenci proti trombóze a dále při léčbě akutní žilní trombózy. Jeho hladina v krvi pacienta musí být pečlivě a přesně sledována jak během operace, tak i následné rekonvalescence<sup>29</sup>. Patří do farmakologické skupiny označované jako antikoagulantia, kdy oproti druhé a třetí skupině vykazuje antikoagulační účinek jak in vivo, tak in vitro<sup>28</sup>. Heparin byl objeven již v roce 1916 ve Spojených státech a stal se jedním z nejstarších klinicky využívaných léčiv<sup>29</sup>. Vlastnostmi jde o mírně hygroskopický, bílý až slabě nažloutlý prášek, který se snadno rozpouští ve vodě<sup>27</sup>.

Antikoagulační účinnost heparinu je vyjadřována v mezinárodních jednotkách (IU – International Unit). Stanovuje se in vitro porovnáním schopnosti heparinu zpomalovat za daných podmínek srážení citrónové ovčí plazmy se stejnou schopností referenčního přípravku heparinu. Mezinárodní jednotka odpovídá účinnosti, která je obsažena v deklarovaném množství mezinárodního standardu. Tím je lyofilizovaná sodná sůl heparinu připravená z vepřové střevní mukózy<sup>27</sup>. Hodnota účinnosti mezinárodního standardu<sup>30</sup>, vyhlášená Světovou zdravotnickou organizací, je 130 IU mg<sup>-1</sup>.

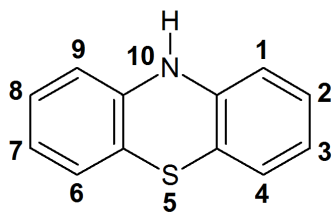


**Obr. 5:** Základní strukturní jednotka heparinu

Stanovení heparinu je velmi důležitou úlohou v oblasti chemie a medicíny a proto na toto téma byla vypracována již celá řada technik. K nejvýznamnějším patří metody biologické<sup>31</sup>, které jsou mnohdy časově náročné a obtížně reprodukovatelné. Z dalších metod to je např. vysoce účinná kapalinová chromatografie se spektrofluorimetrickou detekcí<sup>32</sup>, micelární elektrokinetická kapilární chromatografie s UV detekcí<sup>33</sup>, rezonanční Reyleighův rozptyl záření<sup>34</sup>, iontová chromatografie s pulzní amperometrickou detekcí<sup>35</sup>, cyklická voltametrie s využitím iontově-kanálového snímače<sup>36</sup>, cyklická voltametrie založená na interakci heparinu s methylenovou modří<sup>37</sup> a potenciometrie s rotující polyiontově-citlivou membránovou elektrodou<sup>38</sup>. Stanovení průtokovou injekční analýzou<sup>1</sup>, založené na reakci s fenothiazinovými barvivy s využitím spektrofotometrické detekce, je zmíněno již v úvodu. Další spektrofotometrická stanovení spočívají v navázání heparinu na vysoce selektivní receptor obsahující amonné ionty a novou aminokyselinu s kyselinou boritou<sup>39</sup> nebo v interakci heparinu se safraninem T<sup>40</sup>. Popsána jsou také stanovení spektrofluorimetrická, kdy heparin zvyšuje intenzitu fluorescence doxycyklin-europitého komplexu<sup>41</sup>, případně lomefloxacin-terbititého<sup>42</sup> nebo norfloxacin-ceritého komplexu<sup>43</sup>. Existuje i metoda zhášení fluorescence fluorescein-isothiokyanát-protaminu reakcí s heparinem<sup>44</sup>. V krvi lze heparin stanovit určením aktivovaného parciálního tromboplastinového času pomocí piezoelektrického křemenného krystalu<sup>45</sup>.

### 2.3. Fenothiazin a jeho deriváty

Fenothiazin (CAS: 92-84-2), též nazývaný dibenzothiazin ( $C_{12}H_9NS$ ) je žlutá nebo zelená krystalická sloučenina odvozená od thiazinu. Látka není rozpustná ve vodě, rozpouští se však v horké kyselině octové, benzenu a etheru. Pomalu se rozkládá na slunečním světle a její relativní molekulová hmotnost je 199,27. Strukturně se jedná o tricyklickou aromatickou sloučeninu tvořenou dvěma benzenovými kruhy, které jsou spojeny atomy dusíku a síry (obr. 6).



**Obr. 6:** Strukturní vzorec fenothiazinu

Fenothiazin je základní molekulou velkého množství léčiv s širokým využitím v klinické a veterinární praxi. Samotná sloučenina je biologicky aktivní, což se projevuje jejími insekticidními, fungicidními, antibakteriálními a anthelmintickými účinky<sup>46</sup>.

Velmi významné jsou fenothiazinové deriváty, které obsahují substituenty v polohách 2 a 10 nebo 3 a 7. Fenothiazinové deriváty substituované na pozici 2 a 10 jsou známé svou působností na psychickou aktivitu a ve farmakologii tvoří důležitou skupinu neuroleptik, hypnotik a antialergetik<sup>47</sup>. Dále jsou využívány také v anesteziologii či dermatologii, kde se uplatňuje jejich fotochemoterapeutická účinnost proti rakovinným nádorům. Mnoho fenothiazinových derivátů je používáno také v analytické chemii např. jako redoxních indikátorů při bichromatometrických, cerimetrických, bromatometrických, iodometrických, vanadometrických a komplexometrických titracích. Jsou to především deriváty substituované v polohách 3 a 7, kam patří fenothiazinová barviva a stejně tak i deriváty substituované na pozicích 2 a 10 (cit.<sup>47</sup>). Aplikace založené na redoxních vlastnostech fenothiazinových barviv jsou často komplikovány dimerizací molekul barviva ve vodných prostředích<sup>48</sup>. Tvorba dimerů, případně až polymerů, nastává ve vodě při koncentracích barviv větších jak  $10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> a způsobuje odchylky od Lambertova-Beerova zákona<sup>49</sup>.

Všechny fenothiazinové deriváty mají v UV oblasti podobné spektrální vlastnosti, projevující se v absorpčních spektrech výskytem dvou hlavních pásů v rozmezí 210 – 280 nm a 300 – 317 nm. Hodnota molárního absorpčního koeficientu závisí na typu rozpouštědla, přičemž jeho nejvyšší hodnoty je dosaženo v roztoku ethanolu. Naopak tvar a poloha absorpčních pásů není volbou rozpouštědla nijak ovlivněna<sup>47</sup>.

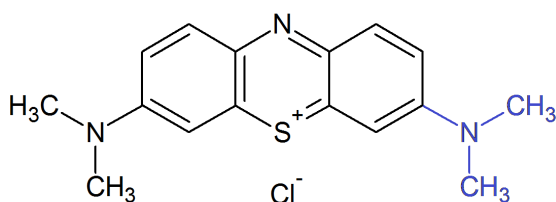
Po ozáření UV světlem vykazují fenothiazinové deriváty fluorescenční vlastnosti, které byly zkoumány vzhledem k jejich chemické struktuře, oxidačním stavům, teplotě a pH pro možnost aplikace při chemických stanoveních<sup>50</sup>. Intenzita fluorescence fenothiazinových derivátů je silně závislá na pH a době ozáření<sup>51</sup>. Článek, publikovaný od Laassisa<sup>51</sup>, obsahuje výčet 35 metod pro jejich stanovení (např. TLC, GC, HPLC, FIA, UV-VIS spektrofotometrie, spektrofluorimetrie).

Pro stanovení heparinu byla v této diplomové práci použita následující fenothiazinová barviva: methylenová modř, azur A a azur B. Všechny tyto fenothiazinové deriváty mají v poloze 7 navázán dimethylamin a liší se pouze funkční skupinou na pozici 3, kde je navázán buď dimethylamin (MM), amin (azur A) či methylamin (azur B).

### 2.3.1. Methylenová modř

Methylenová modř (CAS: 61-73-4) je látka se systematickým názvem 3,7-bis(dimethylamino)-fenothiazin chlorid ( $C_{16}H_{18}N_3SCl$ ). Její strukturní vzorec je znázorněn na obrázku 7. Jedná se o tmavě zelenou až namodralou krystalickou látku, případně krystalický prášek bronzového lesku. Rozpouští se ve vodě nebo alkoholu a získaný roztok má temně modrou barvu. Bezvodá methylenová modř má relativní molekulovou hmotnost 319,85; její trihydrát (CAS: 7220-79-3) pak 373,90 (cit.<sup>52</sup>). Absorpční maximum vykazuje při vlnové délce 664 nm.

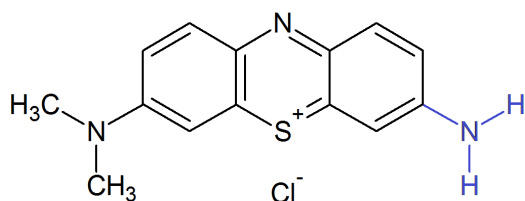
Stejně tak jako ostatní látky této skupiny je methylenová modř široce používána jako biologické barvivo pro barvení mikroorganismů pod mikroskopem a díky svým redoxním vlastnostem jako indikátor. Její další využití je např. jako desinfekční prostředek, barvivo pro barvení textilu, kůže, papíru, případně léků. S organickými nebo komplexními anorganickými ionty vytváří iontové asociáty, které lze extrahovat do organických rozpouštědel. Těto vlastnosti se využívá v extrakční spektrofotometrii<sup>49</sup>.



*Obr. 7: Strukturní vzorec methylenové modři*

### 2.3.2. Azur A

Azur A (CAS: 531-53-3) má systematický název 3-amino-7-dimethylamino-fenothiazin chlorid ( $C_{14}H_{14}N_3SCl$ ). Vlastnostmi jde o zelený až tmavě hnědý prášek, který je středně rozpustný ve vodě. Látka má relativní molekulovou hmotnost 291,80. Maximum absorpce má při vlnové délce 633 nm<sup>53</sup>. Struktura této sloučeniny je znázorněna na obr. 8.

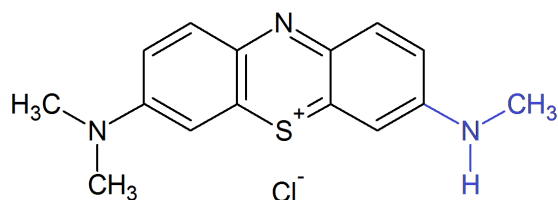


*Obr. 8: Strukturní vzorec azur A*

Azur A se uplatňuje např. při titračním stanovení anionogenních tenzidů<sup>54</sup>, dále pak při stanovení glykosaminglykanů gelovou elektroforézou<sup>55</sup> a spektrofotometricky<sup>56</sup>. Publikováno bylo také rychlé kolorimetrické stanovení heparinu v krevní plazmě<sup>57</sup>.

### 2.3.3. Azur B

Azur B (CAS: 531-55-5) je sloučenina systematického názvu 3-methylamino-7-dimethylamino-fenothiazin chlorid ( $C_{15}H_{16}N_3SCl$ ). Strukturální vzorec této látky, jejíž relativní molekulová hmotnost je 305,83, je zobrazen na obrázku 9. Jedná se o hygroskopický, tmavě zelený krystalický prášek rozpustný ve vodě a mírně rozpustný v alkoholu, který nevykazuje zápach<sup>58</sup>. Uvedená látka má absorpční maximum při vlnové délce 645 nm.



**Obr. 9:** Strukturální vzorec Azur B

Azur B vytváří, podobně jako ostatní látky z její skupiny, iontové páry s různými anionty, čehož se využívá při extrakčně spektrofotometrických stanoveních komplexů některých kovů, např. uranu<sup>59</sup>. Známé jsou také metody, kde je Azur B použit při stanovení penicilinu<sup>60</sup> a sacharinu<sup>61</sup> spektrofotometricky, aminokyselin kapilární zónovou elektroforézou se spektrofluorimetrickou detekcí<sup>62</sup> či jodidových iontů fotochemickou redukcí Azur B<sup>63</sup>.

## 2.4. Statistické zpracování výsledků měření

### 2.4.1. Bodové odhady

Bodové odhady jsou typem statistických odhadů, ve kterých je přibližná hodnota neznámého parametru, vyjadřována pomocí jediného čísla<sup>64</sup>. Pro statistické zpracování naměřených dat byly v této diplomové práci použity následující typy bodových odhadů.

#### 2.4.1.1. Aritmetický průměr

Aritmetický průměr<sup>65</sup> je nejběžněji používaným, nestranným, velmi vydatným odhadem očekávané hodnoty, který téměř úplně odstraňuje vliv náhodných chyb. Pro menší soubory dat však není příliš robustní. Určuje se jako součet všech výsledků ( $x_1 - x_n$ ) ze série paralelních stanovení, dělený počtem provedených měření  $n$ .

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (2.1)$$

#### 2.4.1.2. Medián

Pro malé soubory analytických výsledků je, namísto aritmetického průměru, vhodnější očekávanou hodnotu odhadnout pomocí mediánu<sup>65</sup>. Medián je střední hodnota z výběru seřazeného podle velikosti ( $x_1 \leq x_2 \leq \dots \leq x_n$ ). U souboru s lichým počtem hodnot se medián  $\tilde{x}$  určí jako prostřední hodnota. Pro soubor se sudým počtem hodnot se medián  $\tilde{x}$  vypočte jako aritmetický průměr dvou prostředních hodnot. Jedná se o nestranný a robustní odhad, který však není příliš vydatný.

#### 2.4.1.3. Směrodatná odchylka

Směrodatná odchylka<sup>65</sup> je konzistentním, nestranným a velmi vydatným odhadem vyjadřující míru přesnosti série  $n$  paralelních měření. Její hodnota se určuje podle následujícího vztahu jako odmocnina sumy čtverců odchylek jednotlivých měření dělená počtem měření zmenšeným o jednu ( $n-1$ ).

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (2.2)$$

#### 2.4.1.4. Relativní směrodatná odchylka

Směrodatná odchylka je metrologickou charakteristikou přesnosti výsledků, charakterizuje tedy náhodné chyby. Charakteristikou relativní hodnoty náhodné chyby je relativní směrodatná odchylka<sup>65</sup>, která se vyjadřuje jako poměr odhadu směrodatné odchylky a aritmetického průměru. Často bývá udávána v procentech.

$$s_r (\%) = 100 \frac{S}{\bar{x}} \quad (2.3)$$

#### 2.4.2. Deanův a Dixonův test

Na ojedinělé výsledky v daném souboru analytických výsledků byl aplikován Deanův a Dixonův test<sup>65</sup> pro odlehlé výsledky. Na základě tohoto testu lze ojedinělé výsledky, které jsou zatížené hrubou chybou, z daného souboru výsledků vyloučit, jsou-li shledány jako odlehlé. Za použití vzestupně seřazených výsledků ( $x_1 \leq x_2 \leq \dots x_{n-1} \leq x_n$ ) se podle následujícího vztahu 2.4 určuje parametr  $Q$ , který se porovnává s tabelovanými kritickými hodnotami Deanova a Dixonova rozdělení.

$$Q = \frac{|x_{(i)} - x_{(i-1)}|}{x_n - x_1} \quad (i)=1,n \quad (2.4)$$

#### 2.4.3. Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce je nejnižší množství stanovované látky ve vzorku, které může být danou analytickou metodou detekováno. IUPAC definuje mez detekce jako koncentraci analytu, které odpovídá signál rovný trojnásobku směrodatné odchylky ( $3\sigma$ ) signálu nulového vzorku. Mez stanovitelnosti je nejnižší množství stanovované látky ve vzorku, které může být danou analytickou metodou kvantitativně stanoveno s přijatelným stupněm přesnosti. Podle IUPAC je mez stanovitelnosti definována jako koncentrace analytu, které odpovídá signál rovný desetinásobku směrodatné odchylky ( $10\sigma$ ) signálu nulového vzorku.



## 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1. Přístrojové vybavení a instrumentace

- Spektrofluorimetr Aminco Bowman Series 2 (Aminco, USA) pro snímání spekter, vybavený křemennou kyvetou tloušťky 1 cm
- Spektrofluorimetr Hitachi F-1050 (Hitachi, Japonsko) jako detektor pro měření fluorescence, vybavený průtokovou křemennou kyvetou o objemu 10  $\mu$ l
- Spektrometr HR4000 se světelným zdrojem USB-DT a DT-MINI-2-GS a optickými vlákny QP600-2-SR o průměru 600  $\mu$ m jako detektor pro měření absorbance, využívaný s průtokovou „Z“ celou tloušťky 1 cm nakonfigurovanou pro měření absorbance (vše Ocean Optics, USA)
- Programovatelná pístová pumpa 74901-05 (Cole Parmer, USA) s injekční stříkačkou o objemu 2,5 ml (Sulpeco, USA) pro realizaci nosného toku
- Osmicestný selekční ventil (VICI Valco, USA) pro řazení reakčních zón
- Dvoucestný přepínací ventil (Cole Parmer, USA)
- Řídicí karta 6036E (National Instruments, USA) s externím panelem BNC-2110 (National Instruments, USA) pro analogový sběr dat a ovládání selekčního ventilu
- Teflonové spojovací kapiláry o vnitřním průměru 0,5 a 0,8 mm (VICI Valco, USA) příslušných délek
- Mísící a reakční cívky o objemech 100, 150 a 300  $\mu$ l (vlastní výroba), tvořené teflonovými kapilárami (vnitřní průměr 0,5 mm; délek přibližně 50, 75 a 150 cm) stočenými do spirál
- Počítač s procesorem Pentium 4 (Autocont, ČR) vybavený softwarem LabView 7.1. (National Instruments, USA) pro ovládání SIA aparatury, Origin 6.0 (OriginLab, USA) pro vyhodnocování a vizualizaci dat, SpectraSuite (Ocean Optics, USA) pro ovládání spektrometru HR4000

### 3.2. Použité chemikálie

- Heparin Sandoz, heparin sodný, injekční roztok o aktivitě 25 000 IU 5 ml<sup>-1</sup> (Sandoz GmbH, Rakousko). Zásobní roztok o koncentraci 50 000 IU dm<sup>-3</sup> byl připraven použitím 1 ml injekčního roztoku heparinu, který byl deionizovanou vodou doplněn na objem 100 ml.

- Heparin sodný, prášek o aktivitě  $110 \text{ IU mg}^{-1}$ . Zásobní roztok o koncentraci  $100 \text{ mg dm}^{-3}$  ( $11\,000 \text{ IU dm}^{-3}$ ) byl připraven rozpuštěním 50 mg práškového heparinu v deionizované vodě a doplněním na objem 500 ml.
- Methylenová modř, 3,7-bis(dimethylamino)-fenothiazin chlorid,  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{SCl}$  ( $M_r = 319,85$ ), (Lachema, Brno). Zásobní roztok o koncentraci  $5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  byl připraven rozpuštěním 0,0160 g methylenové modři v deionizované vodě a doplněním na objem 100 ml.
- Azur A, 3-amino-7-dimethylaminofenothiazin chlorid,  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{SCl}$  ( $M_r = 291,8$ ), (Sigma Aldrich, USA). Zásobní roztok o koncentraci  $5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  byl připraven rozpuštěním 0,0146 g azuru A v deionizované vodě a doplněním na objem 100 ml.
- Azur B, 3-methylamino-7-dimethylaminofenothiazin chlorid,  $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{SCl}$  ( $M_r = 305,83$ ), (Loba-Chemie, Wein). Zásobní roztok o koncentraci  $5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  byl připraven rozpuštěním 0,0153 g azuru B v deionizované vodě a doplněním na objem 100 ml.
- Hydrogenfosforečnan sodný – heptahydrát,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $M_r = 268,07$ ), (Merck, SRN).
- Dihydrogenfosforečnan draselný,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $M_r = 136,09$ ), (Merck, SRN).

Zásobní roztoky byly uchovávány v dobře uzavřených baňkách, chráněných před světlem a v chladu. Pracovní roztoky požadovaných koncentrací byly připravovány ředěním zásobních roztoků deionizovanou vodou.

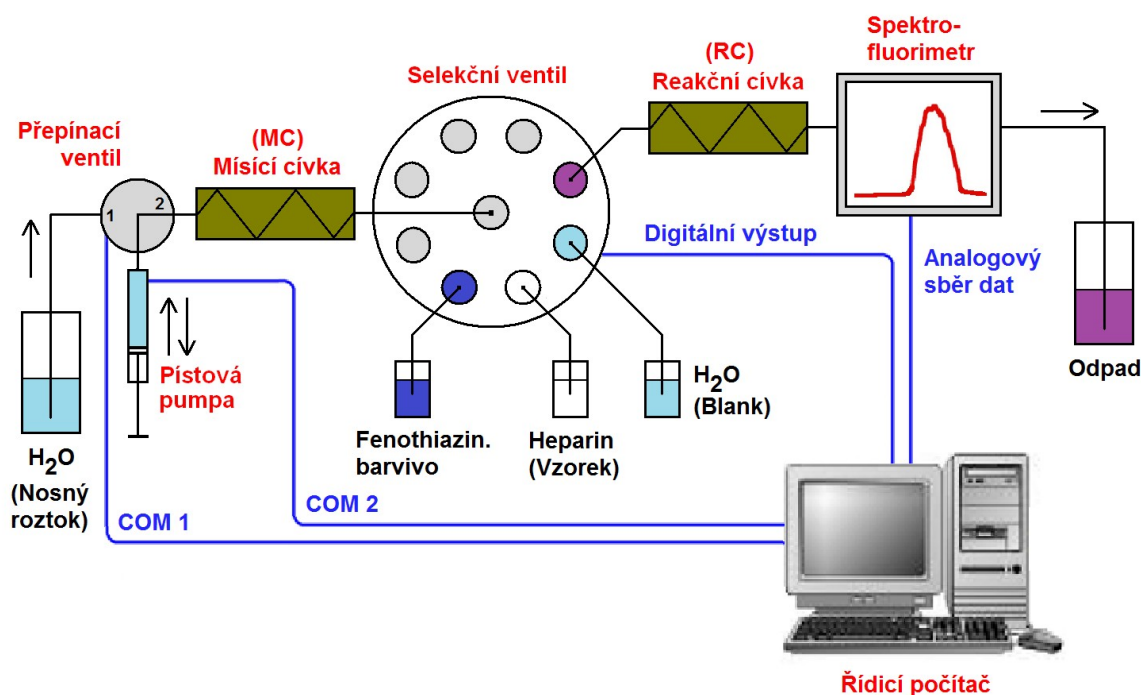
### 3.3. Aparatura použitá pro SIA stanovení heparinu

Pro spektrofluorimetrické (dále i spektrofotometrické) stanovení heparinu reakcí s fenothiazinovým barvivem byla sestavena aparatura pro sekvenční injekční analýzu, jež se skládá z pístové pumpy, injekční stříkačky o objemu 2,5 ml, dvoucestného přepínacího ventilu, mísící cívky, osmicestného selekčního ventilu, spektrofluorimetru Hitachi F-1050 s průtokovou kyvetou, (spektrofotometru HR4000), řídicího počítače s ovládacím softwarem a případně reakční cívky. Její jednotlivé části jsou pospojovány teflonovými kapilárami o vnitřním průměru 0,5 mm potřebných délek tvořící vlastní průtokový systém.

V této diplomové práci jsou uvažovány dvě varianty průtokového uspořádání. První varianta počítá s použitím deionizované vody jako nosného roztoku, do kterého je nejprve nadávkována zóna barviva a poté heparinu. Ve druhé variantě je jako nosný roztok použito fenothiazinové barvivo, do kterého se dávkuje pouze zóna heparinu.

#### 3.3.1. Spektrofluorimetrická detekce – nosný roztok voda

Konfigurace SIA aparatury, při níž je jako nosný roztok použita deionizovaná voda, je schematicky znázorněna na následujícím obrázku 10, kde černé přímky představují průtokové vedení a modré spojnice nastiňují propojení jednotlivých komponent s řídicím počítačem.



**Obr. 10:** Schéma aparatury pro spektrofluorimetrické SIA stanovení heparinu – nosný roztok voda

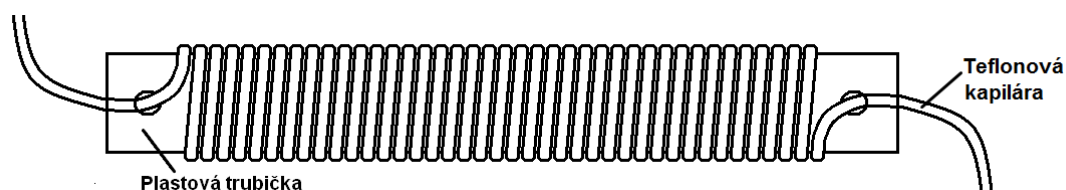
Při zahájení procesu analýzy je celé průtokové vedení SIA aparatury naplněno pouze nosným roztokem, což je stav po skončení předchozí analýzy. Na začátku každé analýzy dojde k naplnění injekční stříkačky, umístěné v těle pístové pumpy, příslušným objemem deionizované vody ze zásobní lahvičky (přepínací ventil v poloze 1), která slouží jako nosný roztok. Ve druhém kroku dojde k přepnutí ventilu do polohy 2, selekční ventil se otočí do pozice s fenothiazinovým barvivem a dalším pohybem pístu injekční stříkačky dojde k nadávkování této zóny do prostoru mísící cívky.

Stejným způsobem je následně nadávkována buď zóna deionizované vody (blank) nebo zóna analyzovaného roztoku heparinu (vzorek), přepnutím selekčního ventilu do příslušné pozice. Dávkované objemy lze definovat pomocí doby pohybu pístu injekční stříkačky při konstantní rychlosti. Mísící cívka v této aparatuře slouží jednak jako zásobárna pro nadávkované zóny a jednak jako pojistka proti jejich vniknutí do prostoru injekční stříkačky. Celková suma dávkovaných objemů je proto limitována objemem použité mísící cívky. V další fázi analytického procesu dojde k přepnutí selekčního ventilu do pozice detektor a obrácením směru pohybu pístu injekční stříkačky je obsah mísící cívky dopraven do průtokové cely spektrofluorimetrického detektoru, kde je sledován pokles intenzity fluorescence fenothiazinového barviva po interakci s heparinem.

V konečné fázi měřicího cyklu reakční zóny doputují do odpadu, čímž se průtokový systém současně promyje nosným roztokem (deionizovaná voda). Toho se na počátku analýzy musí dávkovat dostatečné množství, tak aby došlo k eluci celého píku, tedy přibližně 1100  $\mu\text{l}$ . Pístová pumpa je naprogramována tak, aby píst injekční stříkačky zastavila ve stejné poloze, v jaké byl na samém začátku analýzy (výchozí poloha).

### 3.3.1.1. Mísící a reakční cívky

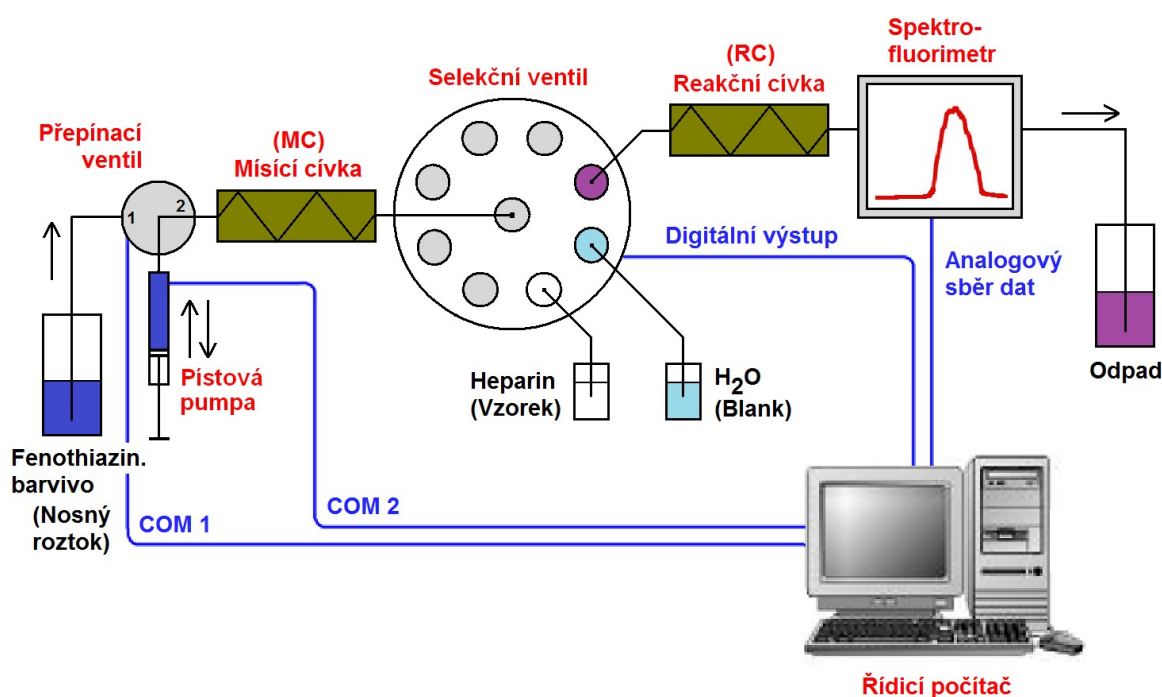
Mísící a reakční cívky, sloužící k rychlému promísení reakčních zón, byly vyrobeny spirálovitým stočením teflonové kapiláry (vnitřní průměr 0,5 mm; délek 50, 100 a 150 cm) okolo plastové trubičky (průměr přibližně 1 cm, vhodná délka). Cívka je schematicky znázorněna na následujícím obr. 11:



**Obr. 11:** Schéma mísící a reakční cívky

### 3.3.2. Spektrofluorimetrická detekce – nosný roztok barvivo

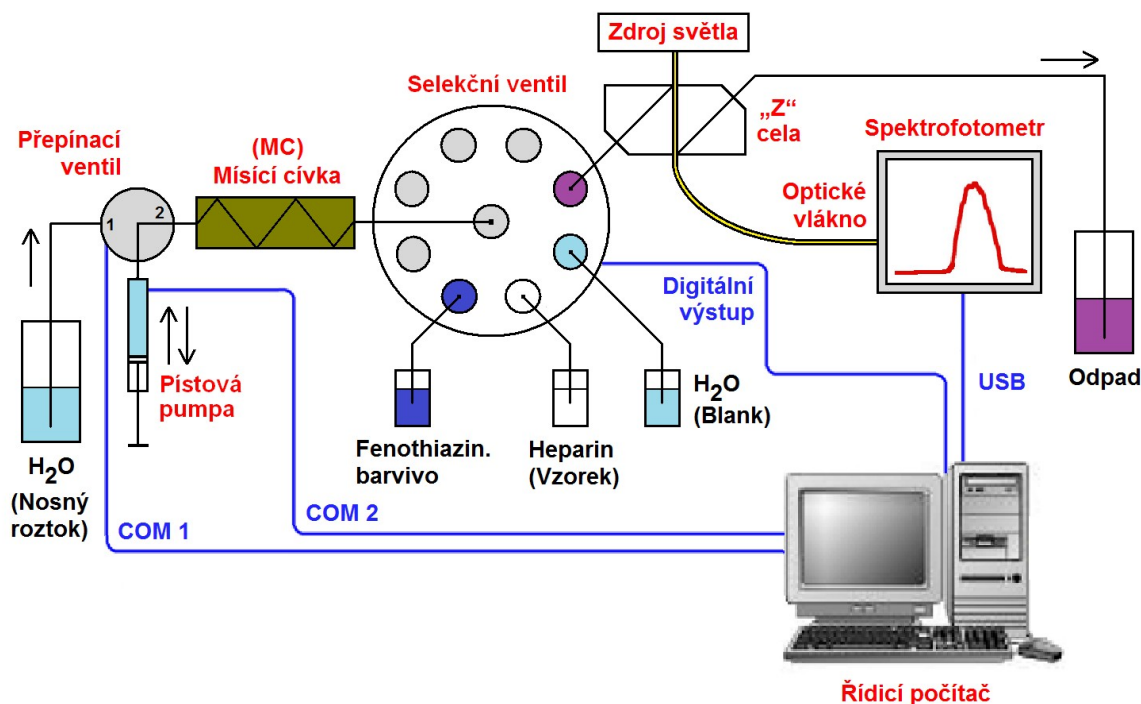
V alternativní konfiguraci SIA stanovení heparinu je jako nosného roztoku využíváno fenothiazinové barvivo. Pro toto uspořádání je použita stejná aparatura jako v předchozím případě a platí zde i výše popsany postup procesu analýzy. Jediný rozdíl spočívá v odlišné manipulaci s činidly, kdy namísto deionizované vody je nosným roztokem barvivo, do kterého se dávkuje buď zóna analyzovaného roztoku heparinu (analýza) nebo deionizované vody (blank). Dávkování barviva přes selekční ventil v tomto případě odpadá. Konfigurace SIA aparatury pro toto průtokové uspořádání je schematicky znázorněna na dále uvedeném obrázku 12.



**Obr. 12:** Schéma aparatury pro spektrofluorimetrické SIA stanovení heparinu – nosný roztok barvivo

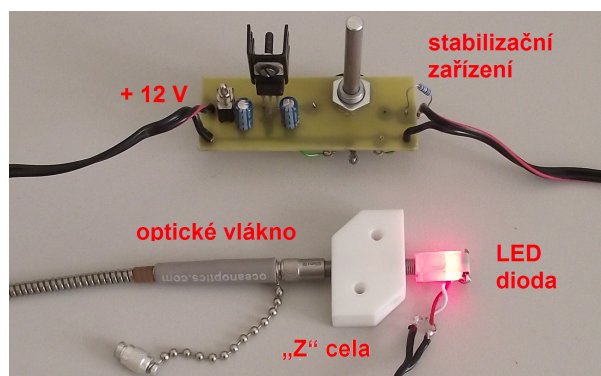
### 3.3.3. Spektrofotometrická detekce

Pro SIA stanovení heparinu byla uvažována také možnost spektrofotometrické detekce spolu s využitím průtokové detekční „Z“ cely a optických vláken pro přenos záření mezi externím světelným zdrojem a externím UV-VIS spektrofotometrickým detektorem (HR4000). Průtoková cela byla umístěna přímo za selekční ventil bez použití reakční cívky. Uspořádání SIA aparatury s uvedenou spektrofotometrickou detekcí je pro případ, kdy je nosným roztokem deionizovaná voda, znázorněno na obrázku 13. Jestliže je nosným roztokem barvivo je, až na způsob detekce, konfigurace stejná jako na obrázku 12.



**Obr. 13:** Schéma aparatury pro spektrofotometrické SIA stanovení heparinu – nosný roztok voda

Jako zdroje záření byly testovány světelné zdroje od firmy Ocean Optics: USB-DT Deuterium Tungsten Halogen (5 V; 1,5 A) a DT-MINI-2-GS Mini Deuterium Tungsten Halogen (12 V; 0,35 A). Dále pak světelné zdroje vlastní výroby s použitím laserových diod (650 nm, 1 mW a 5 mW) a červených LED diod (1 W). Všechny testované diody byly upevněny přímo na detekční „Z“ celu. Ve snaze o maximální stabilizaci zářivého toku diod bylo sestrojeno podpůrné zařízení (obr. 14), které obsahovalo stabilizátor L-4941 (+5 V; 2 %; 0,45 V; 1 A) s chladičem, dva kondenzátory E100M/16VT (100  $\mu$ F, 16 V), potenciometr PC4WK010 (10 k $\Omega$ , lineární, 5 W) a páčkový vypínač. Všechny tyto komponenty byly připájeny na nakreslený plošný spoj, ze kterého byla chloridem železitým odleptána nekrytá vrstva mědi. Zařízení bylo napájeno zdrojem o napětí 12 V.

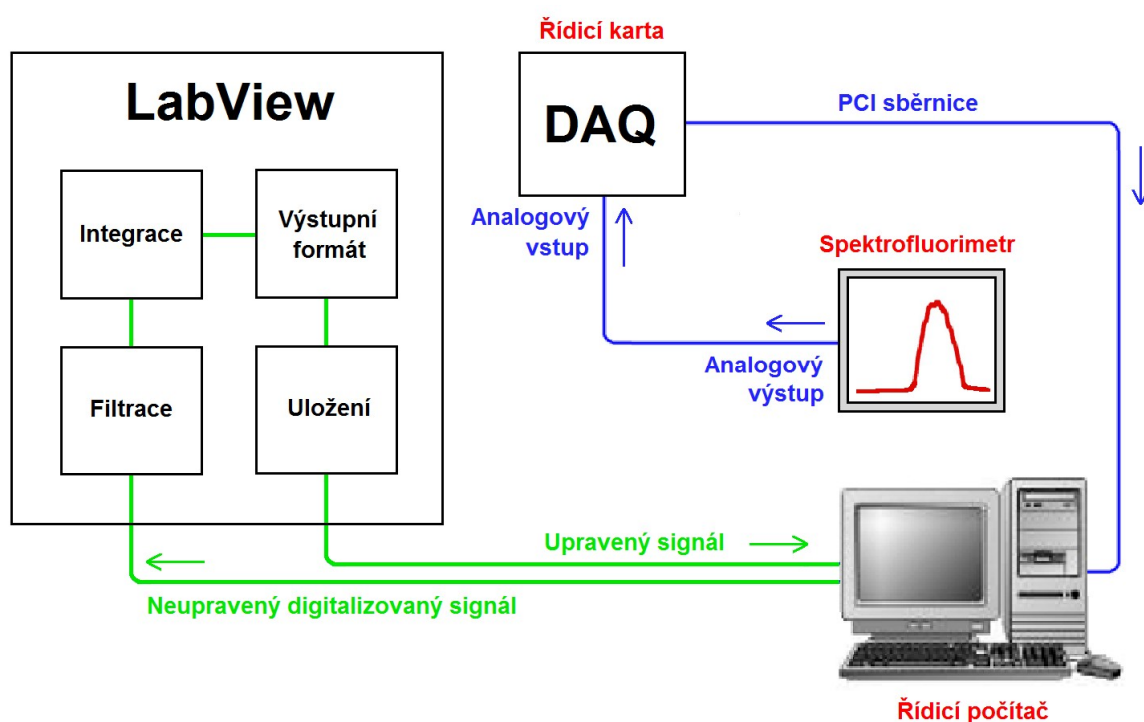


**Obr. 14:** Stabilizační zařízení s LED diodou připevněnou k detekční cele s opt. vláknem

### 3.4. Ovládací software

Sestavenou SIA aparaturu je nutné přes řídicí počítač softwarově ovládat. K tomuto účelu bylo zvoleno grafické programovací prostředí LabView 7.1. (National Instruments, USA). Základem LabView je, na rozdíl od většiny ostatních programovacích jazyků, tzv. G programování. Jedná se o proces, kdy jsou propojováním nejrůznějších grafických prvků, z nichž každý představuje určitou funkci, vytvářena bloková schémata, která jsou následně kompilací převáděna na spustitelný počítačový kód. LabView obsahuje množství knihoven s velkým počtem funkcí například pro sběr a zpracování dat, generování signálů, automatizaci procesů, provádění matematických a statistických operací. Další velkou výhodou oproti jiným vývojovým prostředím představuje rozsáhlá podpora pro přístup k mnoha různým typům zařízení<sup>66</sup>.

Vytvořený ovládací software umožňuje řízení celého procesu analýzy od nadávkování vzorku až po záznam detekovaného signálu. Tento proces se skládá z mnoha dílčích úkonů, které jsou díky počítačovému řízení prováděny stále stejně a mají tak velkou reprodukovatelnost. Naprogramovaný software zajišťuje dokonale synchronizované ovládání (obr. 10, 12 a 13) pístové pumpy (COM 2), dvoucestného přepínacího ventilu (COM 1) a osmicestného selekčního ventilu (digitální výstup z řídicí karty). Dále pak sběr, zpracování a uložení detekovaného signálu ze spektrofluorimetrického detektoru (analogový vstup do řídicí karty). Schéma tohoto procesu je znázorněno na obrázku 15.



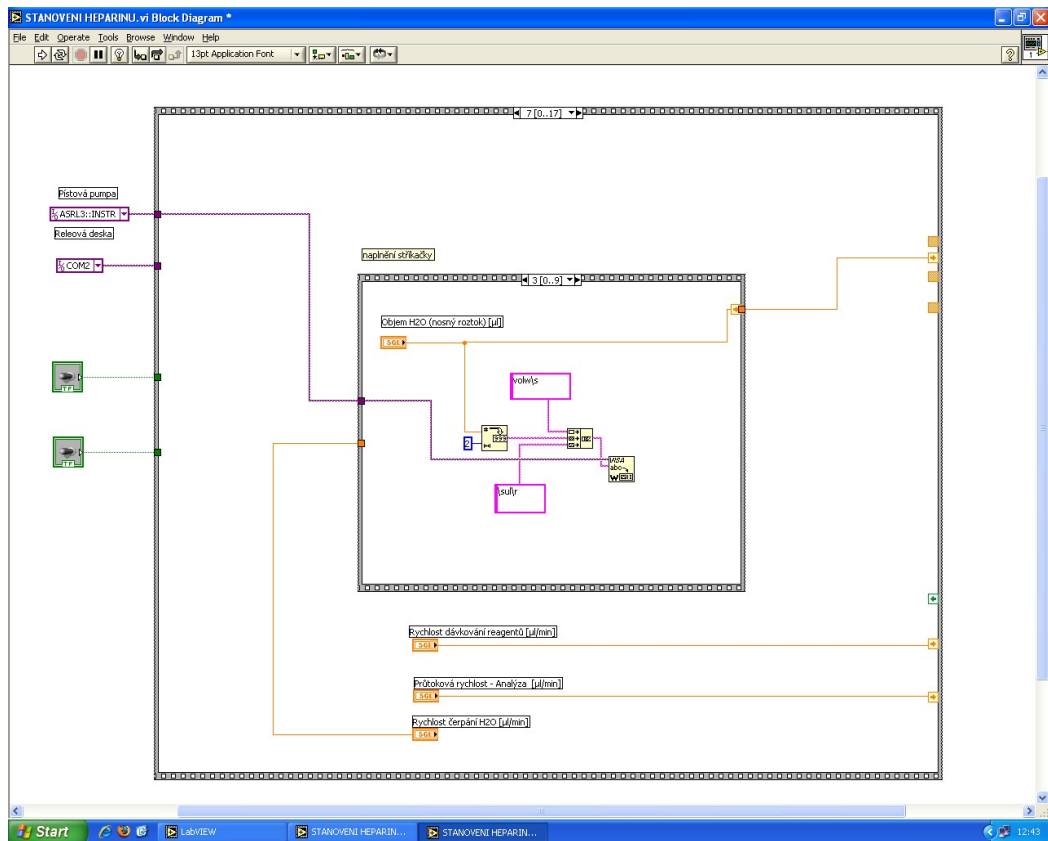
Obr. 15 : Schéma zpracování výstupních dat ze spektrofluorimetru ovládacím softwarem

Přímo z kontrolního panelu ovládacího software, který vznikl pospojováním potřebných grafických prvků (pro ilustraci znázorněno na obrázku 16), lze jednoduše volit parametry průtokového stanovení, zadáním hodnot do příslušných políček. Okno ovládacího software pro variantu, kdy je nosným roztokem deionizovaná voda, je uvedeno na obrázku 17. Takto je možné nadefinovat rychlost čerpání deionizované vody (nosný roztok), její objem, rychlost dávkování reakčních činidel, průtokovou rychlost pro transport reakčních zón do detektoru, dávkované objemy příslušného fenothiazinového barviva a analyzovaného roztoku heparinu (vzorek). Kontrolní panel dále obsahuje přepínací tlačítko pro volbu požadovaného měření (blank, analýza). Kliknutím na tlačítko START dojde k vyvolání dialogového okna pro název a umístění souboru dat měření za daných parametrů a následně k zahájení procesu analýzy. Po ukončení analýzy (zastavení pístu injekční stříkačky ve výchozí poloze) je sběr dat ukončen kliknutím na tlačítko STOP. Analogový signál, získávaný ze spektrofluorimetrického detektoru, má rozměr napětí a je registrován v jednotkách voltů.

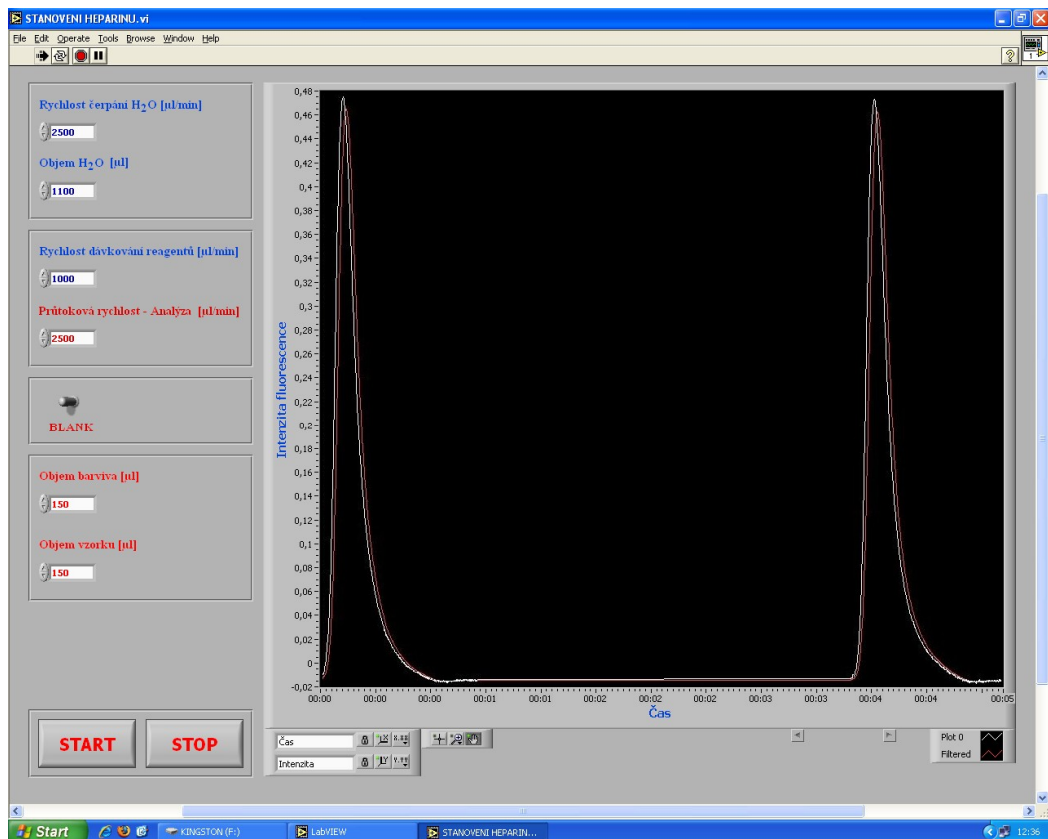
Ve druhé variantě stanovení, kdy je nosným roztokem fenothiazinové barvivo, je z panelu ovládacího software pouze odebrána možnost volby dávkovaného objemu barviva a jsou upraveny popisky parametrů týkající se nosného roztoku (rychlost čerpání a objem). Ostatní prvky ovládacího software zůstávají nezměněny a platí pro něj výše uvedené charakteristiky.

V případě měření se spektrofotometrickou detekcí byl pro sběr, zpracování a ukládání detekovaného signálu využíván software SpectraSuite (Ocean Optics, USA) dodaný ke spektrometru. Tyto kroky proto byly z vytvořeného ovládacího software odstraněny.





Obr. 16: Ukázka blokového schématu ovládacího software (grafické prvky v LabView)



Obr. 17: Kontrolní panel vytvořeného ovládacího software pro SIA aparaturu, nosný roztok voda

## 4. VÝSLEDKY MĚŘENÍ A DISKUSE

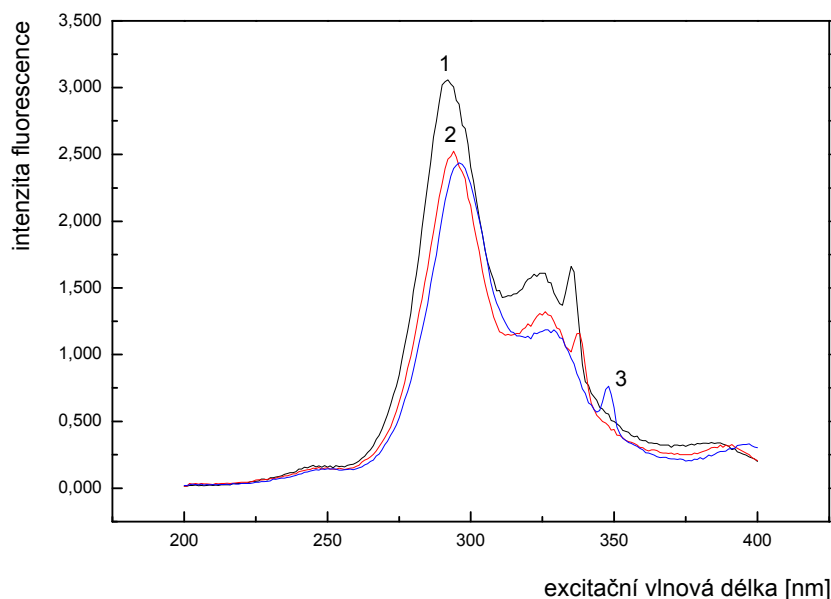
Spektrofluorimetrické stanovení heparinu je v této diplomové práci založeno na faktu, že při interakci roztoku heparinu a fenothiazinového barviva (azur A, azur B, methylenová modř) ve vodném prostředí dochází k tvorbě iontového asociátu<sup>49</sup>, jehož vznik se v emisních spektrech fenothiazinových barviv projevuje poklesem intenzity fluorescence, který je nejvíce patrný v maximech emise jednotlivých barviv.

Spektrofotometrické stanovení heparinu funguje na stejném principu vzniku iontového asociátu. Přítomnost roztoku heparinu se v absorpčních spektrech jednotlivých barviv projevuje poklesem absorbance v absorpčních maximech, jak je popsáno v práci zabývající se spektrofotometrickým FIA stanovením<sup>49</sup>. Tedy při vlnové délce 630 nm pro azur A, 644 nm pro azur B a 664 nm pro methylenovou modř.

### 4.1. Statická měření

#### 4.1.1. Excitační spektra fenothiazinových barviv

V rámci statických měření byly nejprve nalezeny vlnové délky excitačních a emisních maxim jednotlivých barviv. Excitační spektrum pro každé barvivo bylo proměřeno v rozsahu 200 – 400 nm v jeho emisním maximu. Profily získaných excitačních spekter pro azur A, azur B a methylenovou modř jsou uvedeny na obrázku 18.



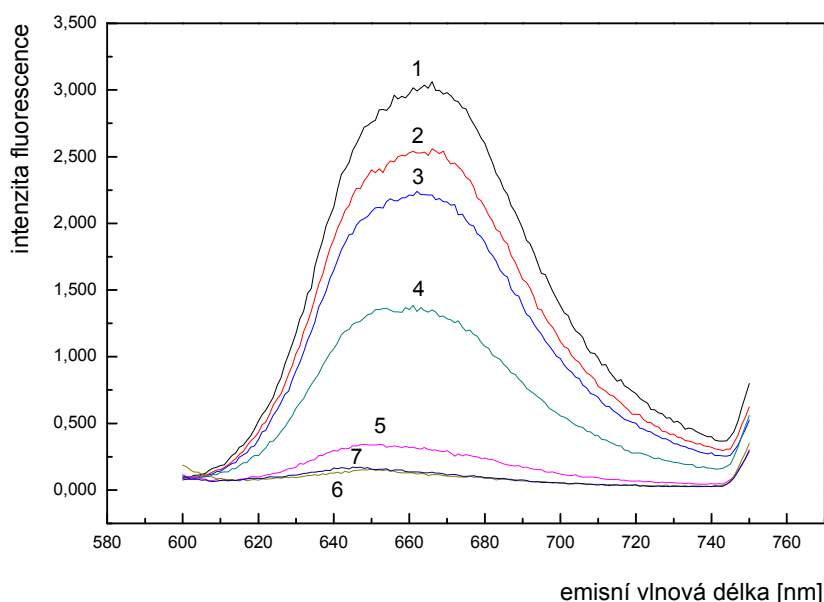
**Obr. 18:** Excitační spektra použitých fenothiazinových barviv

1 – azur A; 2 – azur B; 3 – methylenová modř;  $c_{\text{barviv}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{em}} \text{ aA} = 670 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} \text{ aB} = 675 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} \text{ mM} = 690 \text{ nm}$ ;  $U_{\text{detektoru}} = 850 \text{ V}$ ;  $v_{\text{scanu}} = 1,5 \text{ nm s}^{-1}$

Z proměřených excitačních spekter je patrné, že polohy excitačních maxim jednotlivých barviv se vzájemně liší jen velmi málo a odpovídají hodnotám: 293 nm pro azur A, 295 nm pro azur B a 297 nm pro methylenovou modř.

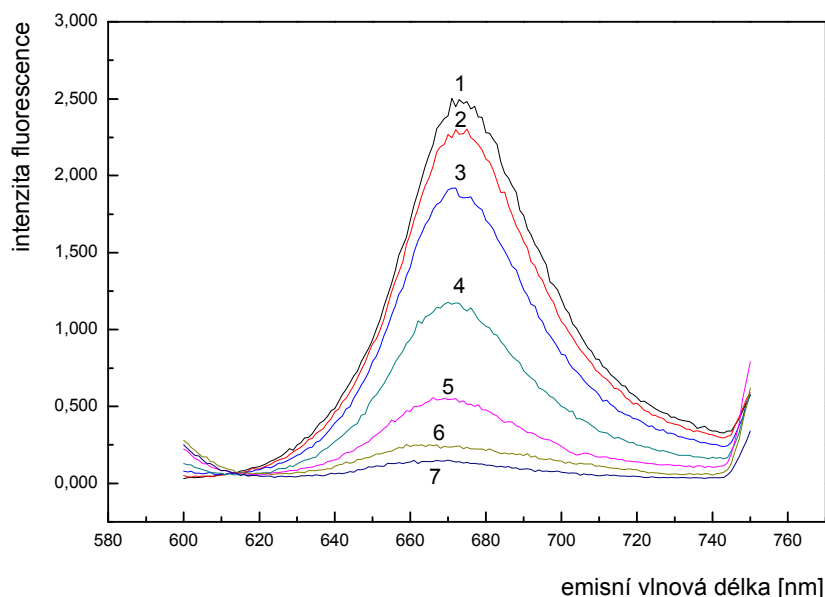
#### 4.1.2. Emisní spektra fenothiazinových barviv

Pro sledovaná barviva byla následně, při vlnových délkách nalezených excitačních maxim, proměřena také emisní spektra a to jednak pro čisté roztoky barviv a jednak pro roztoky barviv se zvyšujícím se obsahem heparinu (aktivita 0 – 1500 IU dm<sup>-3</sup>). Záznamy emisních spekter v rozsahu vlnových délek 600 – 750 nm jsou pro každé barvivo a měnící se obsah přidaného heparinu uvedeny na následujících obr. 19, 20 a 21.



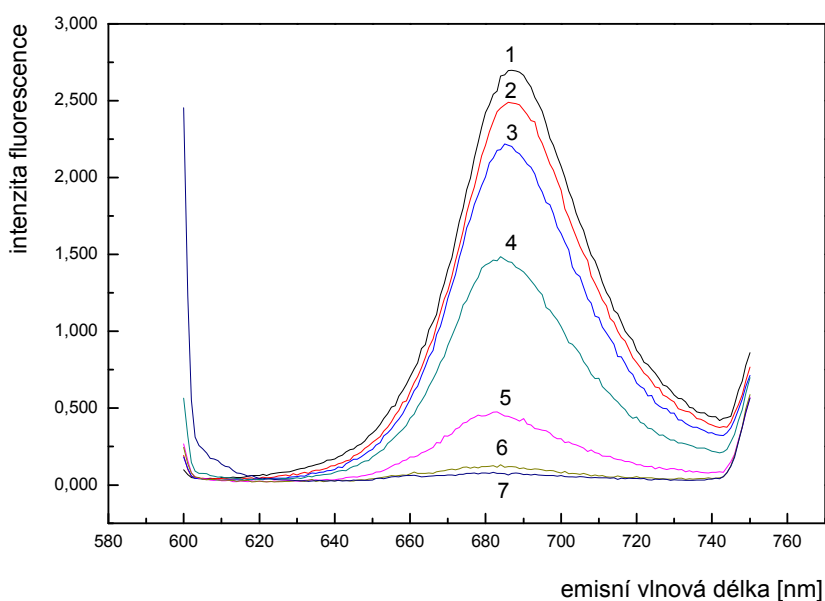
**Obr. 19:** Azur A – emisní spektra pro různé koncentrace heparinu

1 – 0 IU dm<sup>-3</sup> (blank); 2 – 50 IU dm<sup>-3</sup>; 3 – 100 IU dm<sup>-3</sup>; 4 – 200 IU dm<sup>-3</sup>; 5 – 500 IU dm<sup>-3</sup>; 6 – 1000 IU dm<sup>-3</sup>; 7 – 1500 IU dm<sup>-3</sup>;  $c_{\text{azur A}} = 1 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>;  $\lambda_{\text{ex}} = 293$  nm;  $U_{\text{detektoru}} = 850$  V;  $\nu_{\text{scanu}} = 1,5$  nm s<sup>-1</sup>



**Obr. 20:** Azur B – emisní spektra pro různé koncentrace heparinu

1 –  $0 \text{ IU dm}^{-3}$  (blank); 2 –  $50 \text{ IU dm}^{-3}$ ; 3 –  $100 \text{ IU dm}^{-3}$ ; 4 –  $200 \text{ IU dm}^{-3}$ ; 5 –  $500 \text{ IU dm}^{-3}$ ; 6 –  $1000 \text{ IU dm}^{-3}$ ; 7 –  $1500 \text{ IU dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{azur B}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ ;  $U_{\text{detektoru}} = 850 \text{ V}$ ;  $v_{\text{scanu}} = 1,5 \text{ nm s}^{-1}$



**Obr. 21:** Methylenová modř – emisní spektra pro různé koncentrace heparinu

1 –  $0 \text{ IU dm}^{-3}$  (blank); 2 –  $50 \text{ IU dm}^{-3}$ ; 3 –  $100 \text{ IU dm}^{-3}$ ; 4 –  $200 \text{ IU dm}^{-3}$ ; 5 –  $500 \text{ IU dm}^{-3}$ ; 6 –  $1000 \text{ IU dm}^{-3}$ ; 7 –  $1500 \text{ IU dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{methylenové modři}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 297 \text{ nm}$ ;  $U_{\text{detektoru}} = 850 \text{ V}$ ;  $v_{\text{scanu}} = 1,5 \text{ nm s}^{-1}$

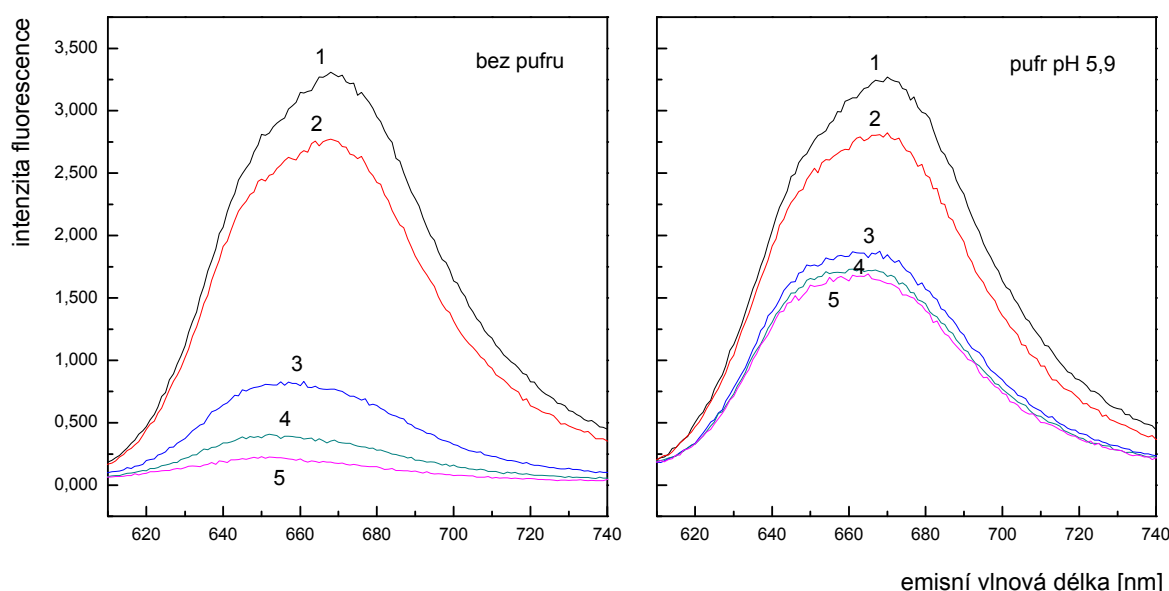
Z výše uvedených emisních spekter je dobře patrný zvyšující se pokles intenzity fluorescence fenothiazinových barviv s rostoucí aktivitou (koncentrací) heparinu, v důsledku vzniku iontového asociátu. Pokles fluorescence se nejvíce projevuje v maximu emise jednotlivých barviv, tedy při vlnové délce 670 nm pro azur A (obr. 19); 675 nm pro azur B (obr. 20) a 687 nm pro methylenovou modř (obr. 21).

S rostoucí aktivitou heparinu je dále patrný mírný posun fluorescenčních maxim ke kratším vlnovým délkám. Tento jev nabývá na síle se zvyšující se koncentrací fenothiazinových barviv. Použitá koncentrace barviv  $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  je kompromisem mezi ještě dostačující intenzitou fluorescence a relativně malým posunem maxim. Ze spekter je dále zřejmé, že azur A má oproti ostatním barvivům nejširší emisní maximum a zároveň vykazuje nejvyšší intenzitu fluorescence.

#### 4.1.3. Vliv pH na spektrofluorimetrické stanovení heparinu

Na základě skutečnosti, že v případě spektrofotometrického FIA stanovení heparinu<sup>49</sup> je změna absorbance, při vzniku iontového asociátu fenothiazinové barvivo-heparin, závislá na hodnotě pH, byla v případě spektrofluorimetrické detekce posuzována i tato možnost. Stejně jako v uvedeném spektrofotometrickém stanovení byl pro úpravu pH použit fosfátový pufr. Pro zvolené barvivo azur A (koncentrace  $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) byla proměřením emisních spekter při pH 5,6; 5,9; 7,0; 8,0 a 9,1 sledována míra poklesu fluorescence roztoků barviva s různou aktivitou heparinu proti slepému pokusu.

Bylo zjištěno, že prostředí fosfátového pufru má při všech sledovaných hodnotách pH potlačující efekt na pokles fluorescence barviva vlivem interakce s heparinem. Vliv přítomnosti fosfátového pufru je pro ilustraci znázorněn na obrázku 22, kde jsou porovnána emisní spektra roztoků bez přítomnosti pufru a v pufru o pH 5,9.



**Obr. 22:** Azur A – porovnání emisních spekter pro různé koncentrace heparinu v prostředí bez stabilizace pH a v prostředí fosfátového pufru o pH 5,9

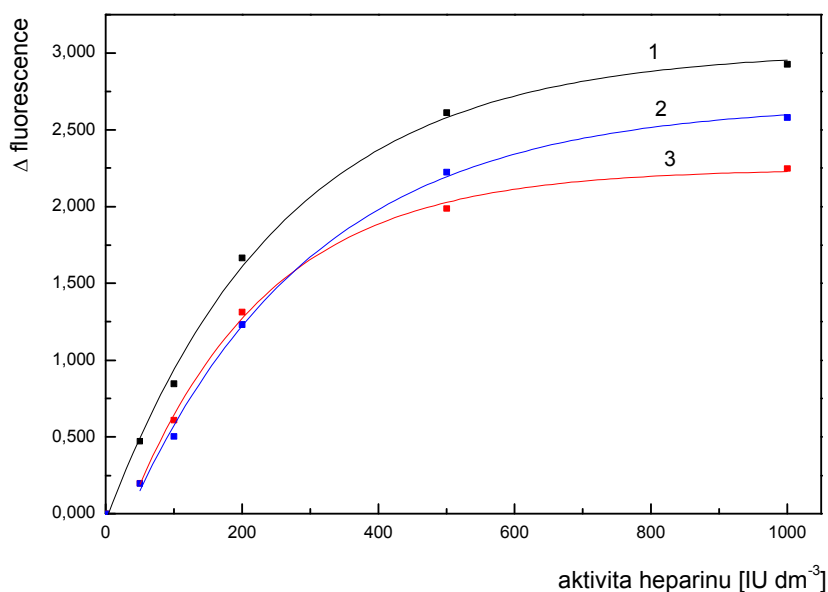
1 –  $0 \text{ IU dm}^{-3}$  (blank); 2 –  $100 \text{ IU dm}^{-3}$ ; 3 –  $500 \text{ IU dm}^{-3}$ ; 4 –  $1000 \text{ IU dm}^{-3}$ ; 5 –  $1500 \text{ IU dm}^{-3}$ ;  
 $c_{\text{azur A}} = 1,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 293 \text{ nm}$ ;  $U_{\text{detektoru}} = 850 \text{ V}$ ;  $v_{\text{scanu}} = 1,5 \text{ nm s}^{-1}$

Z uvedených spekter je dále patrné, že fluorescence azur A není přítomností pufru nijak ovlivněna a je stejná pro všechna sledovaná pH. Pokles fluorescence barviva vlivem interakce s heparinem je blokován tím více, čím se zvyšuje jeho aktivita. Stejné chování nastává i v případě Britton-Robinsonova pufru. Ze spekter bez přítomnosti pufru je s rostoucí aktivitou heparinu vidět výraznější posun emisních maxim oproti nižší koncentraci azur A (obr. 19). Pro další fluorescenční měření není použití pufru uvažováno.

#### 4.1.4. Statické kalibrační závislosti spektrofluorimetrického stanovení heparinu

Vyhodnocením fluorescenčních spekter roztoků barviv, s měnícím se obsahem heparinu z předchozí kapitoly 4.1.2., byly získány statické kalibrační závislosti pro spektrofluorimetrické stanovení heparinu.

Při vlnových délkách maxim emise použitých barviv byly od intenzity fluorescence blanku odečteny signály roztoků barviv s různým obsahem heparinu. Rozdílové signály odpovídající aktivitě heparinu v roztoku byly vyneseny do grafu kalibrační závislosti, která je pro azur A, azur B a methylenovou modř v rozsahu 0 – 1000 IU dm<sup>-3</sup> znázorněna na obrázku 23. Z důvodu nelinearity jsou kalibrační závislosti proloženy exponenciálními křivkami, jejichž parametry včetně hodnot korelačních koeficientů a použitelných dynamických rozsahů jsou uvedeny v tabulce 2.



**Obr. 23:** Statické kalibrační závislosti pro stanovení heparinu s jednotlivými barvivy

1 – azur A; 2 – methylenová modř; 3 – azur B;  $c_{\text{barviv}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{heparinu}} = 0 - 1000 \text{ IU dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} \text{ aA} = 293 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} \text{ aA} = 670 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} \text{ mM} = 297 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} \text{ mM} = 687 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} \text{ aB} = 295 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} \text{ aB} = 675 \text{ nm}$

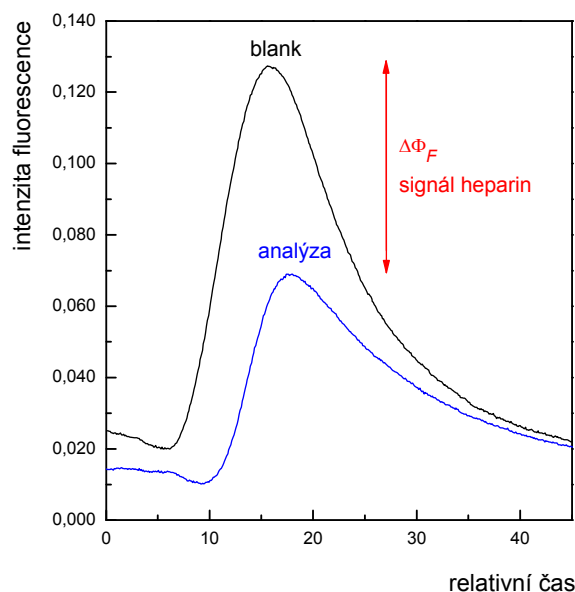
**Tab. 2:** Parametry kalibračních závislostí jednotlivých barviv – statická měření

barvivo	rovnice fitu $y = y_0 + A \exp(R_0 X)$	hodnota parametru	chyba parametru	korelační koeficient	použitelný rozsah [IU dm <sup>-3</sup> ]
azur A	$y_0$	3,0173	$\pm 0,08225$	0,99614	0 – 500
	A	-3,06568	$\pm 0,08928$		
	$R_0$	-0,00389	$\pm 3,24 \times 10^{-4}$		
azur B	$y_0$	2,24584	$\pm 0,04934$	0,99677	50 – 500
	A	-2,6369	$\pm 0,08538$		
	$R_0$	-0,00498	$\pm 4,22 \times 10^{-4}$		
methylenová modř	$y_0$	2,67313	$\pm 0,08335$	0,99603	50 – 500
	A	-3,03457	$\pm 0,09669$		
	$R_0$	-0,00369	$\pm 3,83 \times 10^{-4}$		

Z parametrů regresních křivek statických kalibračních závislostí je patrné, že s použitím azuru B je stanovení nejméně citlivé. Naopak nejvyšší citlivosti stanovení a největšího použitelného dynamického rozsahu je dosaženo pro azur A. Hodnoty korelačních koeficientů exponenciálních funkcí jsou pro všechny kalibrační závislosti srovnatelné.

## 4.2. Spektrofluorimetrické SIA stanovení heparinu, nosný roztok voda

Pro průtokové stanovení heparinu se spektrofluorimetrickou detekcí byla použita aparatura pro sekvenční injekční analýzu, jejíž schéma je uvedeno na obrázku 10. Do nosného roztoku, kterým je deionizovaná voda, se nejprve dává fenothiazinové barvivo a dále analyzovaný roztok heparinu (proces analýzy je podrobně popsán v kapitole 3.3.1.). Detekuje se pokles intenzity fluorescence reakční zóny barviva po interakci se zónou heparinu oproti fluorescenci samotného fenothiazinového barviva (obr. 24). Každé stanovení tedy probíhá ve dvou fázích, přičemž nejprve je změřen signál slepého pokusu (blank), kdy je namísto heparinu dávkován stejný objem deionizované vody (rozpouštědlo) a následně je provedeno měření s analyzovaným roztokem heparinu (analýza). Blank není nutno proměřovat vždy znovu, ale pouze pro každou změnu parametrů průtokového systému. Signál rozdílu výšek detekovaných píků, odpovídající poklesu fluorescence barviva v důsledku vzniku iontového asociátu s heparinem, je úměrný množství heparinu v analyzovaném roztoku  $\Delta\Phi_F = \Phi_{F, \text{barvivo+rozpouštědlo (blank)}} - \Phi_{F, \text{barvivo+heparin v rozpouštědle (analýza)}}$ .



*Obr. 24: Princip stanovení heparinu – nosný roztok voda*

### 4.2.1. Optimalizace spektrofluorimetrického stanovení heparinu

Fluorescenční signál, tedy výšky a tvary detekovaných píků a čas potřebný pro jejich dosažení je při SIA stanovení obecně ovlivněn několika parametry průtokového systému. Dá se předpokládat, že je to především průtoková rychlost nosného roztoku, délka a průměr mísící a reakční cívky (vedení), dávkovaný objem barviva, heparinu a dále



koncentrace použitého barviva. Náplní optimalizačních měření bylo proto najít nejvýhodnější hodnoty výše uvedených parametrů, za kterých by při průtokovém SIA stanovení heparinu bylo dosaženo maximální citlivosti, minimálního rozmytí píků, co nejmenší spotřeby reakčních činidel a nejkratší časové náročnosti analýz.

Pro nalezení optimální hodnoty každého parametru byly v závislosti na různých hodnotách jednoho parametru sledovány výšky a dále i tvary získaných SIA píků, jak pro blank, tak pro analýzu, při konstantních hodnotách všech ostatních parametrů. Optimalizační měření byla prováděna zvlášť pro každé ze sledovaných barviv.

Do grafů byly pro každý parametr vždy vyneseny signály pro blank (černá), analýzu (modrá) a především jejich rozdílový signál (červená), který odpovídá signálu samotného heparinu. K vyhodnocování píků a následné tvorbě grafů byl použit program Origin 6.0. Pod každým grafem jsou kurzívou uvedeny experimentální podmínky.

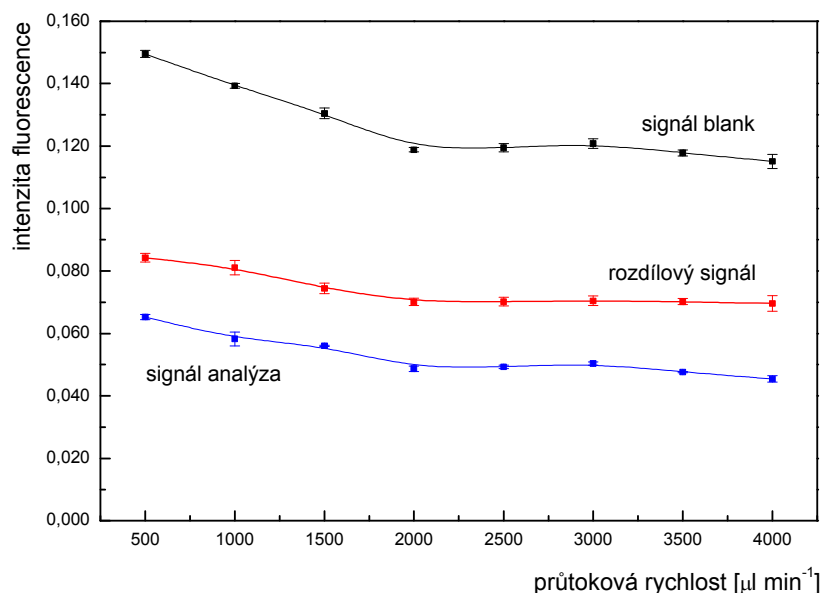
V první fázi optimalizačních měření byla posuzována vhodnost průměru průtokového vedení na SIA stanovení heparinu. Testovány byly teflonové kapiláry o vnitřních průměrech 0,5 a 0,8 mm. Jako vhodnější se ukázal být průměr 0,5 mm, kdy na promývání aparatury bylo zapotřebí podstatně menšího objemu deionizované vody a získané píky byly méně rozmyté v čase. Na druhou stranu bylo, i pro relativně malou sumu dávkovaných objemů činidel, nutno použít mísící cívku o velké délce (150 cm pro přibližně 300  $\mu\text{l}$ ) a při vyšších průtokových rychlostech (od 2000  $\mu\text{l min}^{-1}$ ) docházelo ke zhoršování opakovatelnosti dávkovaných objemů a občasnému vniknutí vzduchových bublinek do mísící cívky a injekční stříkačky. Z toho důvodu byla do ovládacího software přidána volba umožňující nastavit odlišné průtokové rychlosti pro dávkování činidel a pro transport reakčních zón do detektoru; tedy opačný směr. Pro maximální opakovatelnost dávkovaných objemů byla v celé práci použita dávkovací rychlost 1000  $\mu\text{l min}^{-1}$ .

V rámci časové úspory byla do řídicího software zakomponována také volba počáteční rychlosti nasávání deionizované vody (slouží jako nosný roztok). Bylo zjištěno, že maximální rychlost, kterou daná konfigurace SIA aparatury a především použitá injekční stříkačka zvládne (bez vnikání vzduchových bublinek), je 4500 – 5000  $\mu\text{l min}^{-1}$ .

Všechna optimalizační měření probíhala při nalezených vlnových délkách maxim emise a excitace jednotlivých barviv a roztokem heparinu o aktivitě 500 IU  $\text{dm}^{-3}$ . Výchozí hodnoty ostatních parametrů stanovení byly zvoleny následovně: objem mísící cívky 300  $\mu\text{l}$  (délka přibližně 150 cm), délka reakční cívky 75 cm, dávkovaný objem barviva 150  $\mu\text{l}$ , dávkovaný objem vzorku 150  $\mu\text{l}$ , koncentrace barviva  $1 \times 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ .

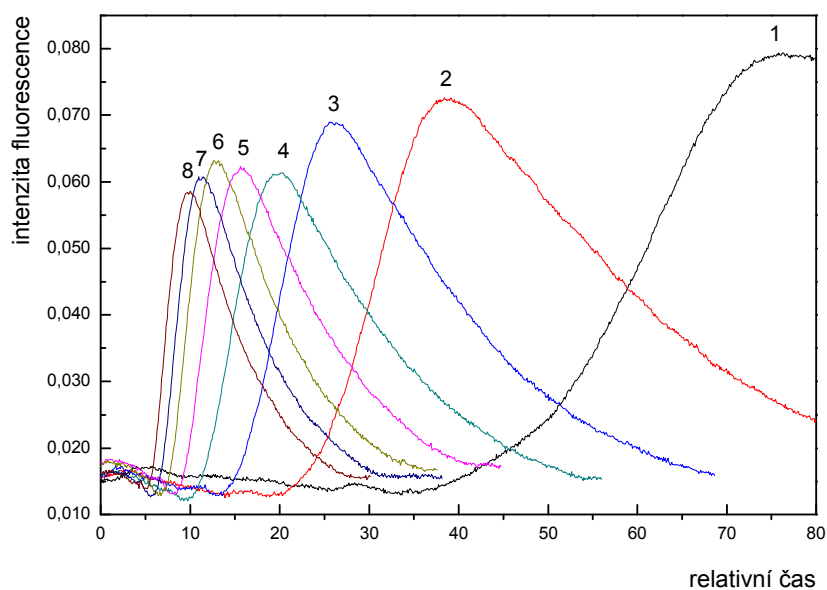
### 4.2.1.1. Vliv průtokové rychlosti

Vliv průtokové rychlosti nosného proudu při transportu reakčních zón do detektoru byl sledován v rozmezí  $500 - 4000 \mu\text{l min}^{-1}$  s velikostí kroku  $500 \mu\text{l min}^{-1}$ . Nalezené závislosti jsou pro jednotlivá barviva uvedeny na obr. 25, 27 a 28. Pro azur A jsou dále zobrazeny zaznamenané píky pro analýzu (obr. 26).



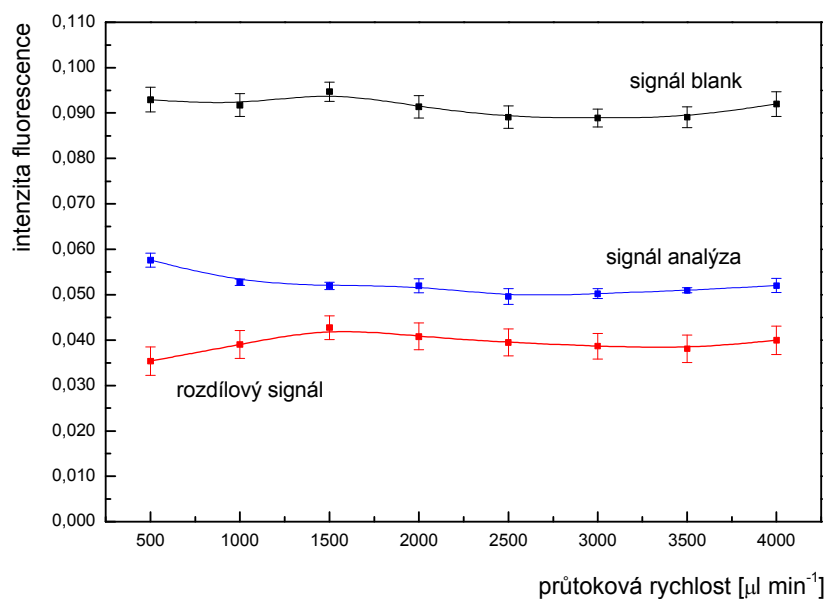
**Obr. 25:** Azur A – vliv průtokové rychlosti nosného proudu

$c_{\text{azur A}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{heparinu}} = 500 \text{ IU dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 293 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 670 \text{ nm}$ ;  $l_{\text{MC}} = 150 \text{ cm}$  ( $\approx 300 \mu\text{l}$ );  $l_{\text{RC}} = 75 \text{ cm}$  ( $\approx 150 \mu\text{l}$ );  $V_{\text{azur A}} = 150 \mu\text{l}$ ;  $V_{\text{vzorku}} = 150 \mu\text{l}$ ,  $v_{\text{průtoku}} = 500 - 4000 \mu\text{l min}^{-1}$



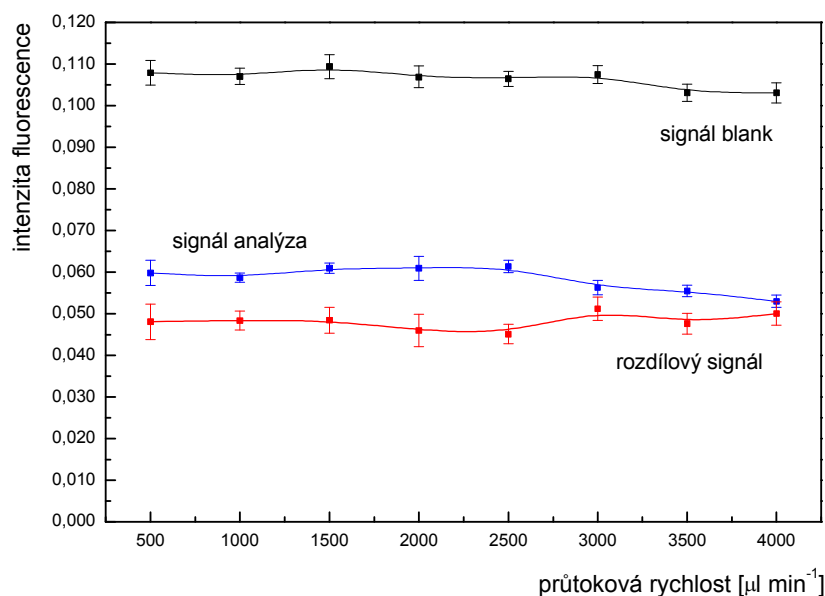
**Obr. 26:** Azur A – vliv průtokové rychlosti nosného proudu (píky pro analýzu)

1 – 500; 2 – 1000; 3 – 1500; 4 – 2000; 5 – 2500; 6 – 3000; 7 – 3500; 8 – 4000  $\mu\text{l min}^{-1}$



**Obr. 27:** Azur B – vliv průtokové rychlosti nosného proudu

$c_{\text{azur B}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{heparinu}} = 500 \text{ IU dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 675 \text{ nm}$ ;  $l_{\text{MC}} = 150 \text{ cm}$  ( $\approx 300 \mu\text{l}$ );  $l_{\text{RC}} = 75 \text{ cm}$  ( $\approx 150 \mu\text{l}$ );  $V_{\text{azur B}} = 150 \mu\text{l}$ ;  $V_{\text{vzorku}} = 150 \mu\text{l}$ ;  $v_{\text{průtoku}} = 500 - 4000 \mu\text{l min}^{-1}$



**Obr. 28:** Metylenová modř – vliv průtokové rychlosti nosného proudu

$c_{\text{metylenové modři}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{heparinu}} = 500 \text{ IU dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 297 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 687 \text{ nm}$ ;  $l_{\text{MC}} = 150 \text{ cm}$  ( $\approx 300 \mu\text{l}$ );  $l_{\text{RC}} = 75 \text{ cm}$  ( $\approx 150 \mu\text{l}$ );  $V_{\text{metylenové modři}} = 150 \mu\text{l}$ ;  $V_{\text{vzorku}} = 150 \mu\text{l}$ ;  $v_{\text{průtoku}} = 500 - 4000 \mu\text{l min}^{-1}$

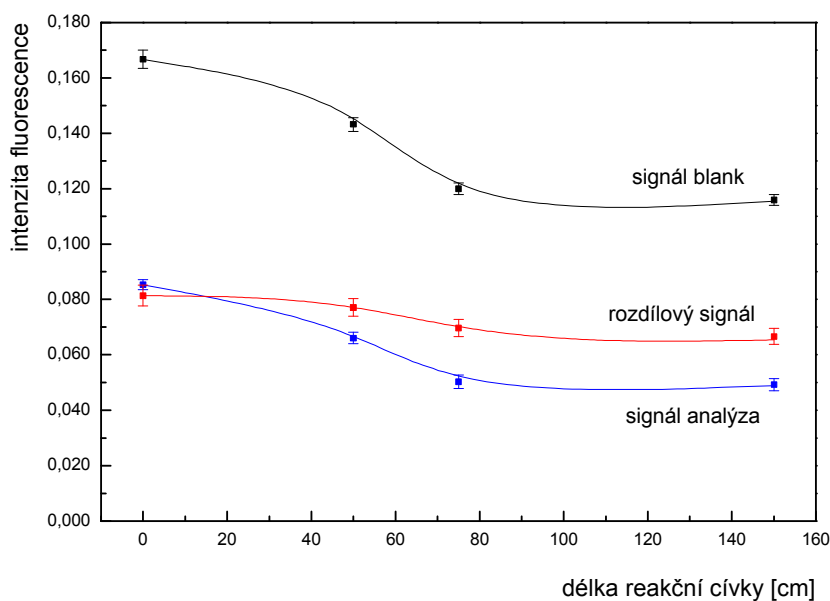
Z grafů je patrné, že v závislosti na průtokové rychlosti se fluorescenční signály mění velmi málo (azur A) nebo jsou v podstatě konstantní (azur B a metylenová modř). Nejvyšších hodnot rozdílového signálu  $\Delta\Phi_F$  (tedy citlivosti stanovení) a zároveň nejvyšších signálů blanku je dosaženo pro barvivo azur A, kde velikost všech signálů klesá v rozmezí průtokových rychlostí 500 až 2000  $\mu\text{l min}^{-1}$  a dále se již téměř nemění. Jako

optimální hodnota byla pro všechna barviva vybrána průtoková rychlost  $2500 \mu\text{l min}^{-1}$ , která je kompromisem mezi co nejkratší dobou analýzy a malým rozmytím získaných píků. Od hodnoty průtokové rychlosti  $3000 \mu\text{l min}^{-1}$  sice rozmytí píků dále mírně klesá, ale naopak výrazněji stoupá objem deionizované vody, která je nutná k propláchnutí aparatury. Při malých rychlostech jsou píky velmi rozmyté v čase z důvodu pomalé rychlosti, potřebný objem deionizované vody se ale naopak zmenšuje. Nalezená optimální hodnota průtokové rychlosti  $2500 \mu\text{l min}^{-1}$  byla použita pro všechna další měření.

#### 4.2.1.2. Vliv délky (objemu) reakční cívky

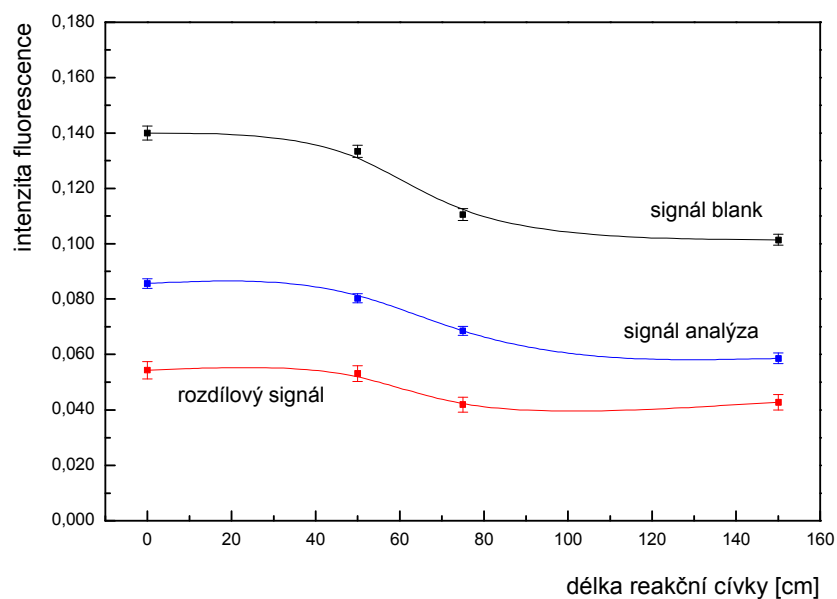
Dalším optimalizovaným parametrem byla délka a tedy i objem reakční cívky. Za tímto účelem byly z teflonových kapilár zhotoveny cívky o délkách 50, 75 a 150 cm (s průměrem 0,5 mm přibližně odpovídají objemům 100, 150 a 300  $\mu\text{l}$ ). Následující obr. 29, 30 a 31 ukazují vliv délky reakční cívky na signály dosažené pro zkoumaná barviva.

Z proměřených závislostí je pro každé z barviv dobře patrný trend poklesu výšek dosažených píků pro blank i pro analýzu s rostoucí délkou (objemem) reakční cívky. Výsledný rozdílový signál je pro všechna barviva nejvyšší v případě nulové délky reakční cívky a s rostoucí délkou dochází k jeho mírnému poklesu. Reakce vzniku iontového asociátu tedy probíhá velmi rychle a reakční cívku, která v tomto případě přispívá pouze k většímu rozmývání píků, není zapotřebí používat a pro další měření již byla z průtokového systému odstraněna.



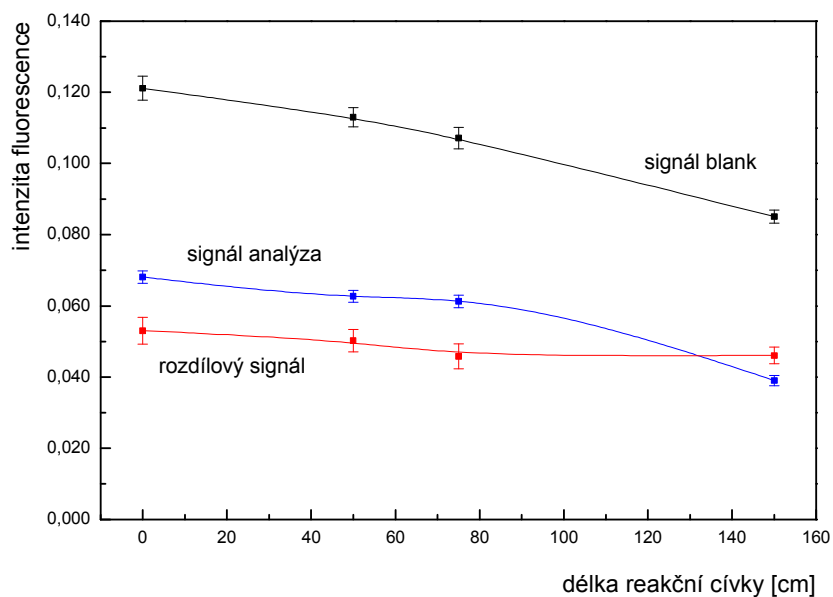
**Obr. 29:** Azur A – vliv délky reakční cívky

$c_{\text{azur A}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{heparinu}} = 500 \text{ IU dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 293 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 670 \text{ nm}$ ;  $l_{\text{MC}} = 150 \text{ cm}$  ( $\approx 300 \mu\text{l}$ );  $l_{\text{RC}} = 0 - 150 \text{ cm}$  ( $\approx 0 - 300 \mu\text{l}$ );  $V_{\text{azur A}} = 150 \mu\text{l}$ ;  $V_{\text{vzorku}} = 150 \mu\text{l}$ ;  $v_{\text{průtoku}} = 2500 \mu\text{l min}^{-1}$



**Obr. 30:** Azur B – vliv délky reakční cívky

$c_{\text{azur B}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{heparinu}} = 500 \text{ IU dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 675 \text{ nm}$ ;  $l_{\text{MC}} = 150 \text{ cm}$  ( $\approx 300 \mu\text{l}$ );  
 $l_{\text{RC}} = 0 - 150 \text{ cm}$  ( $\approx 0 - 300 \mu\text{l}$ );  $V_{\text{azur B}} = 150 \mu\text{l}$ ;  $V_{\text{vzorku}} = 150 \mu\text{l}$ ;  $v_{\text{průtoku}} = 2500 \mu\text{l min}^{-1}$

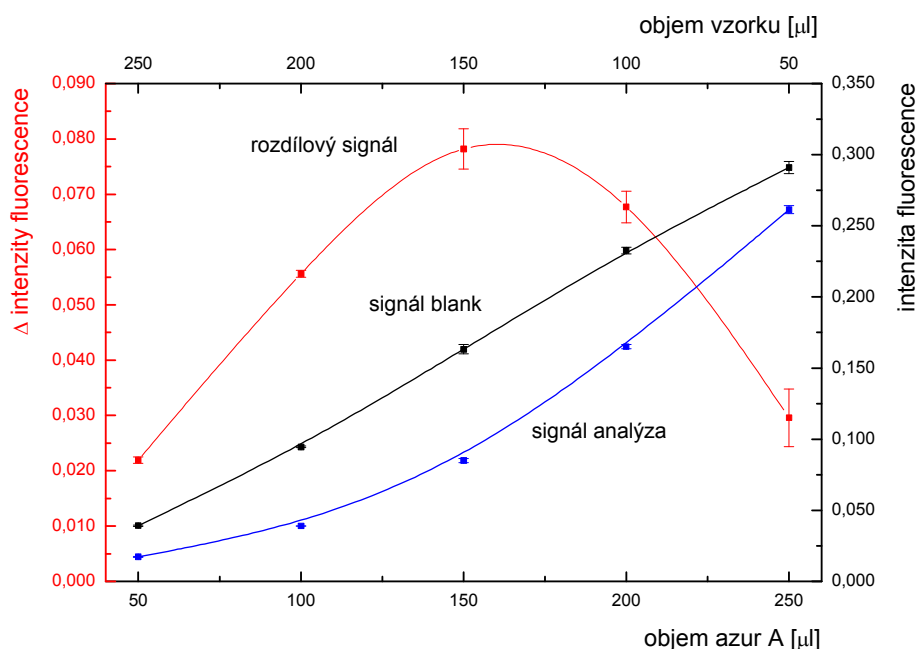


**Obr. 31:** Metylenová modř – vliv délky reakční cívky

$c_{\text{metylenové modři}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{heparinu}} = 500 \text{ IU dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 297 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 687 \text{ nm}$ ;  $l_{\text{MC}} = 150 \text{ cm}$   
( $\approx 300 \mu\text{l}$ );  $l_{\text{RC}} = 0 - 150 \text{ cm}$  ( $\approx 0 - 300 \mu\text{l}$ );  $V_{\text{metylenové modři}} = 150 \mu\text{l}$ ;  $V_{\text{vzorku}} = 150 \mu\text{l}$ ;  $v_{\text{průtoku}} = 2500 \mu\text{l min}^{-1}$

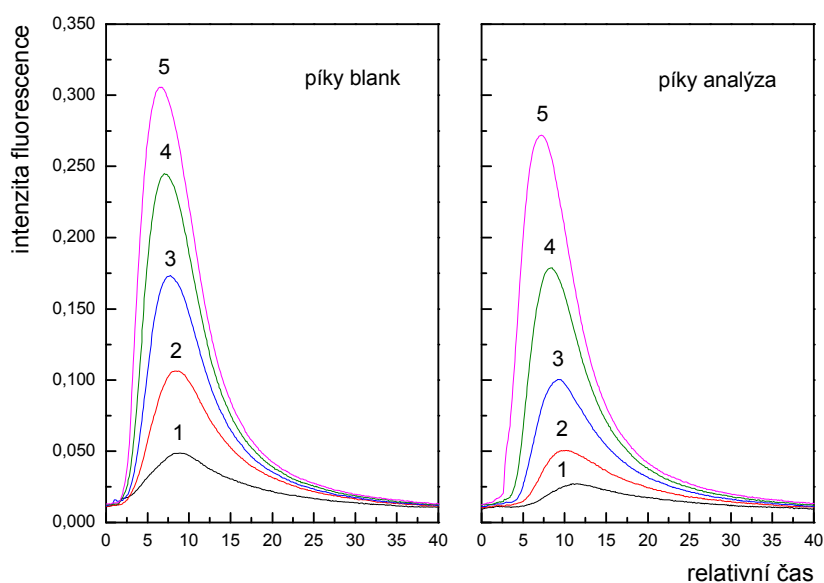
### 4.2.1.3. Vliv dávkovaného objemu fenothiazinového barviva a vzorku

Cílem dalších optimalizačních měření bylo nalézt optimální poměry dávkovaných objemů reakčních činidel. Díky velikosti používané mísící cívky mohla být maximální možná suma dávkovaných objemů 300  $\mu\text{l}$ . Vliv dávkovaného objemu barviva byl sledován v rozmezí 50 – 250  $\mu\text{l}$  při následném nadávkování roztoku heparinu (nebo deionizované vody pro blank), tak aby celková suma byla 300  $\mu\text{l}$ .



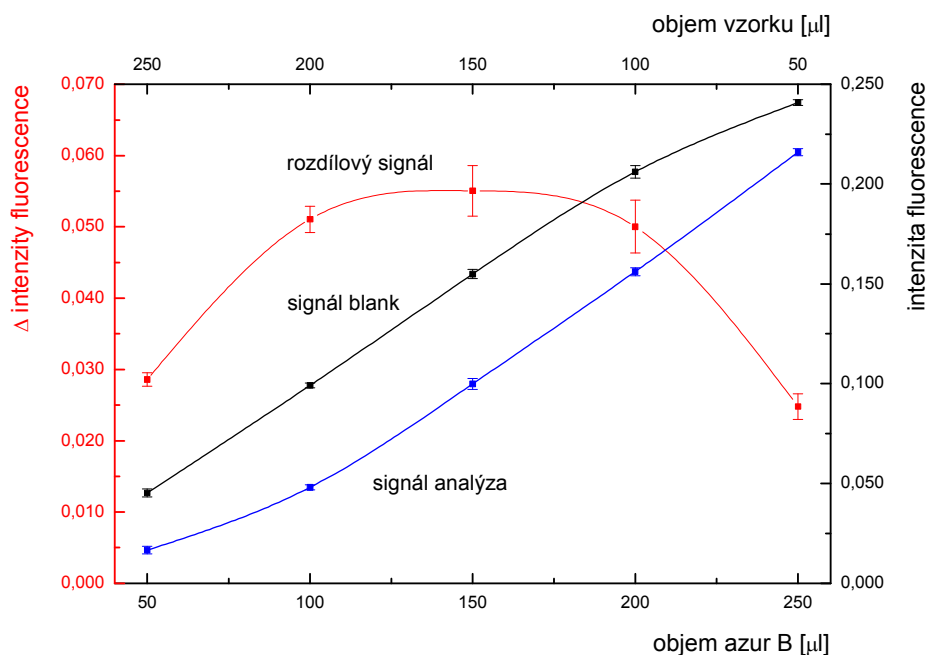
**Obr. 32:** Azur A – vliv dávkovaného objemu barviva a vzorku

$c_{\text{azur A}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{heparinu}} = 500 \text{ IU dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 293 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 670 \text{ nm}$ ;  $l_{\text{MC}} = 150 \text{ cm}$  ( $\approx 300 \mu\text{l}$ );  $l_{\text{RC}} = 0 \text{ cm}$  (bez RC);  $V_{\text{azur A}} = 50 - 250 \mu\text{l}$ ;  $V_{\text{vzorku}} = 50 - 250 \mu\text{l}$ ;  $v_{\text{průtoku}} = 2500 \mu\text{l min}^{-1}$



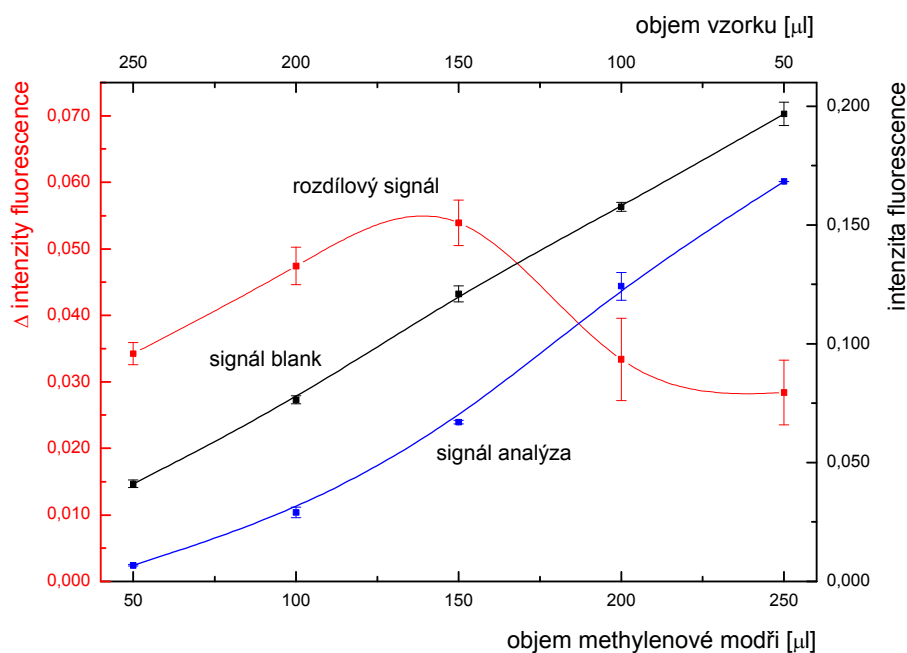
**Obr. 33:** Azur A – vliv dávkovaného objemu barviva a vzorku (píky pro blank a analýzu)

1 – 50/250; 2 – 100/200; 3 – 150/150; 4 – 200/100; 5 – 250/50  $\mu\text{l}$  azur A/vzorku



**Obr. 34:** Azur B – vliv dávkovaného objemu barviva a vzorku

$c_{\text{azur B}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{heparinu}} = 500 \text{ IU dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 675 \text{ nm}$ ;  $l_{\text{MC}} = 150 \text{ cm}$  ( $\approx 300 \mu\text{l}$ );  $l_{\text{RC}} = 0 \text{ cm}$  (bez RC);  $V_{\text{azur B}} = 50 - 250 \mu\text{l}$ ;  $V_{\text{vzorku}} = 50 - 250 \mu\text{l}$ ;  $v_{\text{průtoku}} = 2500 \mu\text{l min}^{-1}$



**Obr. 35:** Metylenová modř – vliv dávkovaného objemu barviva a vzorku

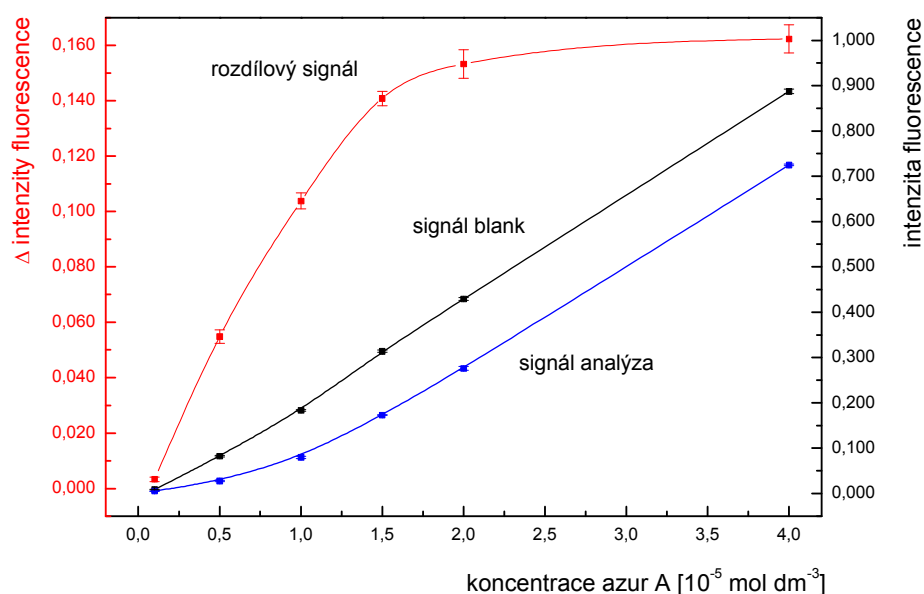
$c_{\text{metylenové modři}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{heparinu}} = 500 \text{ IU dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 297 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 687 \text{ nm}$ ;  $l_{\text{MC}} = 150 \text{ cm}$  ( $\approx 300 \mu\text{l}$ );  $l_{\text{RC}} = 0 \text{ cm}$  (bez RC);  $V_{\text{metylenové modři}} = 50 - 250 \mu\text{l}$ ;  $V_{\text{vzorku}} = 50 - 250 \mu\text{l}$ ;  $v_{\text{průtoku}} = 2500 \mu\text{l min}^{-1}$

Z výše uvedených závislostí vlivu dávkovaných poměrů barviva a vzorku na velikost dosažených fluorescenčních signálů (obr. 32, 34 a 35) je zřejmé, že nejvyššího rozdílového signálu je pro všechna barviva dosaženo při dávkovaném poměru 1:1, tedy při 150 µl barviva a 150 µl vzorku. Tyto hodnoty byly pro všechna další měření vybrány jako

optimální. Pro každé barvivo je dále patrný lineární nárůst výšek píků pro blank s rostoucím dávkovaným objemem barviva. Nejvyšší hodnoty všech signálů poskytuje barvivo azur A, pro které jsou na obr. 33 pro ilustraci ukázány píky naměřené, jak pro blank, tak pro analýzu.

#### 4.2.1.4. Vliv koncentrace fenothiazinového barviva

Posledním optimalizovaným parametrem byl vliv koncentrace barviva na získaný fluorescenční signál, který byl sledován v rozsahu  $(0,1 - 4,0) \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ . Měření byla provedena opět pro každé ze sledovaných barviv, přičemž průběhy nalezených závislostí jsou znázorněny na následujících obr. 36, 37 a 38.



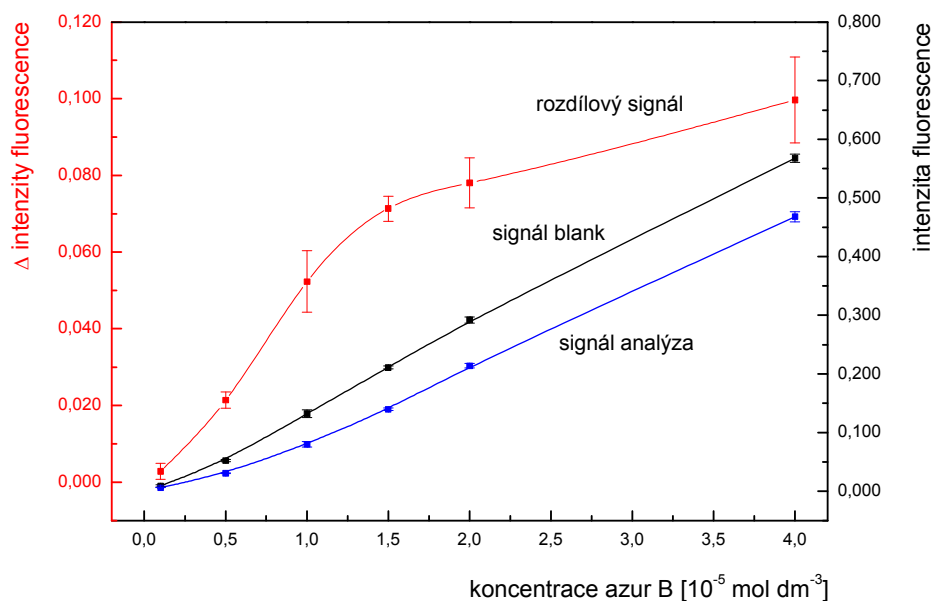
**Obr. 36:** Vliv koncentrace azur A na intenzitu fluorescence

$c_{\text{azur A}} = (0,1 - 4,0) \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{heparinu}} = 500 \text{ IU dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 293 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 670 \text{ nm}$ ;  $l_{\text{MC}} = 150 \text{ cm}$  ( $\approx 300 \mu\text{l}$ );  $l_{\text{RC}} = 0 \text{ cm}$  (bez RC);  $V_{\text{azur A}} = 150 \mu\text{l}$ ;  $V_{\text{vzorku}} = 150 \mu\text{l}$ ;  $v_{\text{průtoku}} = 2500 \mu\text{l min}^{-1}$

Na všech optimalizačních grafech jednotlivých barviv lze pozorovat společný trend lineárního nárůstu signálu blanku s rostoucí koncentrací barviva v celém sledovaném rozsahu. Se zvyšující se koncentrací barviva roste také signál výsledného rozdílového signálu, kdy nejvyšších nárůstů je pro azur A a azur B dosaženo do hodnoty  $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , pro methylenovou modř pak do hodnoty  $2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ .

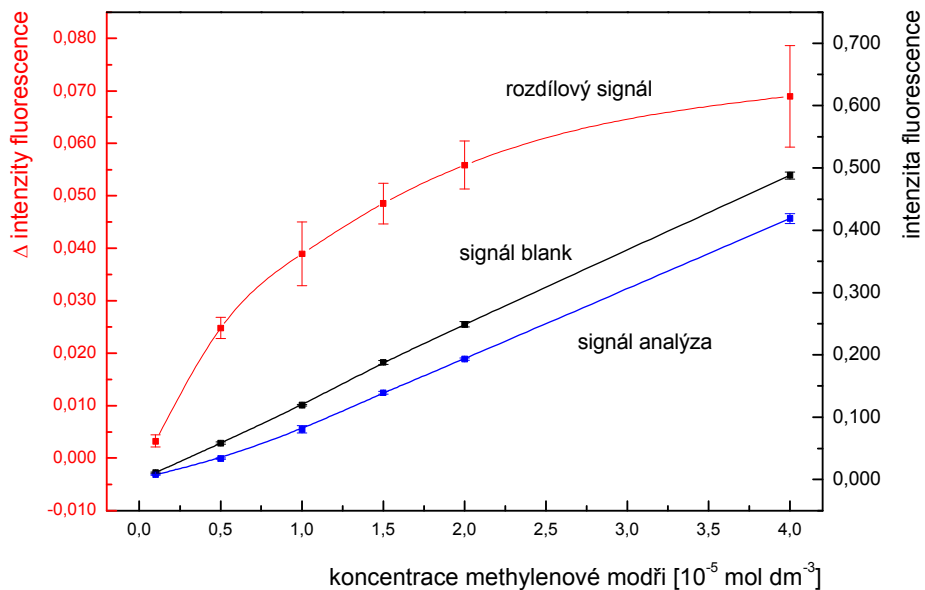
Vzhledem k posunům maxim emise ve fluorescenčních spektrech barviv (kapitola 4.1.2), které se zvětšují s rostoucí koncentrací heparinu a především barviva, lze jako nejvyšší možnou koncentraci barviva použít hodnotu  $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ .





**Obr. 37:** Vliv koncentrace azur B na intenzitu fluorescence

$c_{\text{azur B}} = (0,1 - 4,0) \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{heparinu}} = 500 \text{ IU dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 675 \text{ nm}$ ;  $l_{\text{MC}} = 150 \text{ cm}$  ( $\approx 300 \mu\text{l}$ );  $l_{\text{RC}} = 0 \text{ cm}$  (bez RC);  $V_{\text{azur B}} = 150 \mu\text{l}$ ;  $V_{\text{vzorku}} = 150 \mu\text{l}$ ;  $v_{\text{průtoku}} = 2500 \mu\text{l min}^{-1}$



**Obr. 38:** Vliv koncentrace methylenové modři na intenzitu fluorescence

$c_{\text{methylenové modři}} = (0,1 - 4,0) \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{heparinu}} = 500 \text{ IU dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 297 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 687 \text{ nm}$ ;  $l_{\text{MC}} = 150 \text{ cm}$  ( $\approx 300 \mu\text{l}$ );  $l_{\text{RC}} = 0 \text{ cm}$  (bez RC);  $V_{\text{methylenové modři}} = 150 \mu\text{l}$ ;  $V_{\text{vzorku}} = 150 \mu\text{l}$ ;  $v_{\text{průtoku}} = 2500 \mu\text{l min}^{-1}$

#### 4.2.1.5. Optimální podmínky stanovení heparinu – nosný roztok voda

Pro dosažení maximální citlivosti a zároveň co nejmenší časové náročnosti analýz je, při spektrofotometrickém SIA stanovení heparinu, reakcí s fenothiazinovým barvivem a použitím deionizované vody jako nosného roztoku, vhodné volit nalezené optimální hodnoty sledovaných parametrů, které jsou souhrnně uvedené v následující tabulce 3.

**Tab. 3:** Optimální podmínky spektrofotometrického SIA stanovení heparinu – nosný roztok voda

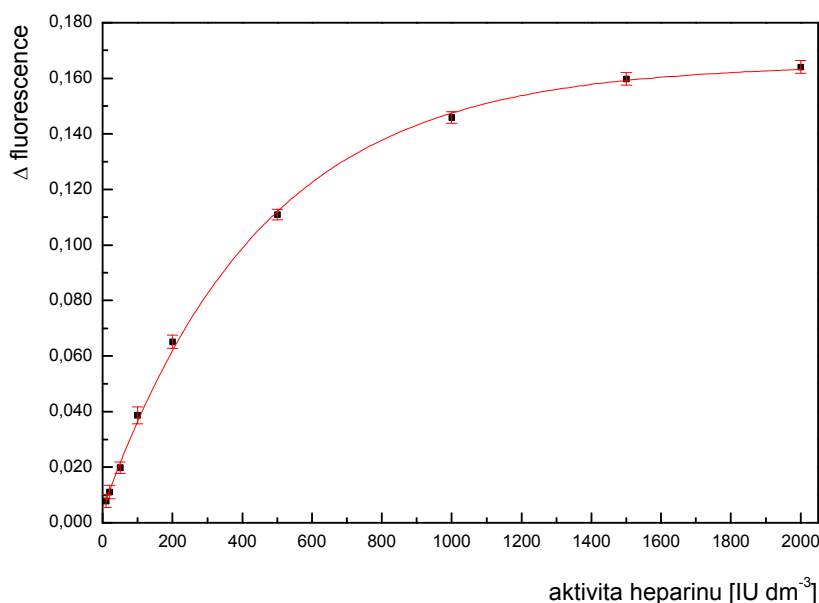
parametr SIA stanovení:	vybraná hodnota		
délka mísící cívky [cm] ( $\approx \mu\text{l}$ )	150 (300)		
délka reakční cívky [cm]	0		
koncentrace barviva [ $\text{mol dm}^{-3}$ ]	$1 \times 10^{-5}$		
dávkový objem barviva [ $\mu\text{l}$ ]	150		
dávkový objem vzorku [ $\mu\text{l}$ ]	150		
průtoková rychlost detektor [ $\mu\text{l min}^{-1}$ ]	2500		
rychlost nasávání nosného roztoku [ $\mu\text{l min}^{-1}$ ]	4500 – 5000		
rychlost dávkování činidel [ $\mu\text{l min}^{-1}$ ]	1000		
	<i>azur A</i>	<i>azur B</i>	<i>methyl. modř</i>
excitační vlnová délka [nm]	293	295	297
emisní vlnová délka [nm]	670	675	687

Z výsledků optimalizačních měření vyplývá, že vybrané optimální hodnoty sledovaných parametrů se pro všechna barviva vzájemně shodují a liší se pouze ve vlnových délkách excitace a emise. Důvodem je velmi obdobné spektrofotometrické chování sledovaných barviv, v závislosti na změnách parametrů stanovení, ať už se jedná o případ interakce s heparinem nebo mimo něj. Odlišnosti se však projevují ve velikostech dosažených signálů, kdy barvivo azur A poskytuje nejvyšší hodnoty.

## 4.2.2. Kalibrační závislosti heparinu – nosný roztok voda

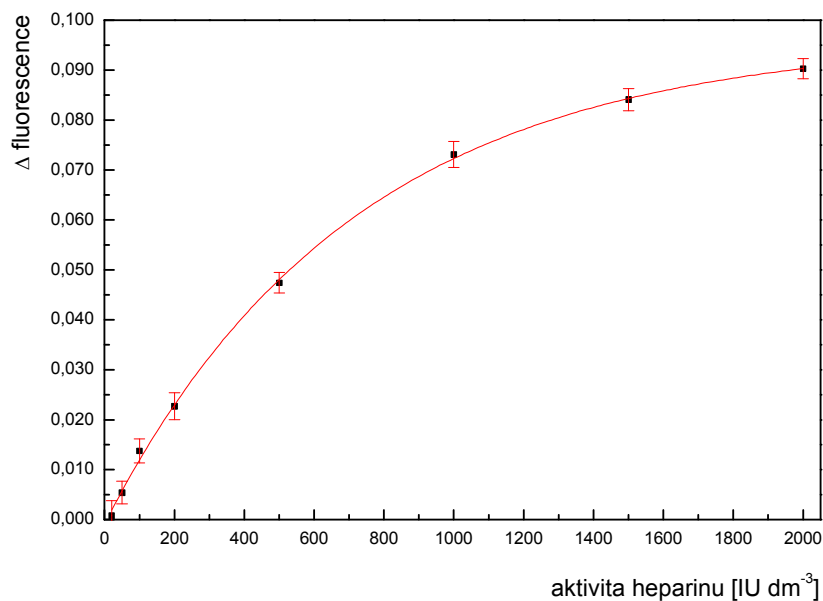
Za nalezených optimálních podmínek (tab. 3) byly pro stanovení heparinu proměřeny kalibrační závislosti v rozsahu  $10 - 3000 \text{ IU dm}^{-3}$  pro všechna sledovaná barviva. Měření každé koncentrace heparinu bylo prováděno vždy 5x a výšky získaných kalibračních píků byly odečteny od 5x změřené hodnoty blanku. Statisticky vyhodnocené rozdílové signály byly v rozmezí  $10 - 2000 \text{ IU dm}^{-3}$  vyneseny do grafů kalibračních závislostí jednotlivých barviv, které jsou znázorněny na obrázcích 39 (azur A), 40 (azur B) a 41 (methylenová modř). Pro vzájemné porovnání jsou navíc kalibrační závislosti vyneseny do jednoho grafu (obr. 42).

Získané kalibrační závislosti mají v celém sledovaném rozsahu exponenciální průběh. Z tohoto důvodu nebylo možné, k proložení experimentálních bodů, použít lineární regresi a namísto toho bylo zvoleno proložení exponenciální křivkou. Parametry regresních křivek jednotlivých barviv, včetně hodnot korelačních koeficientů a použitelného dynamického rozsahu, jsou uvedeny v tabulce 4.



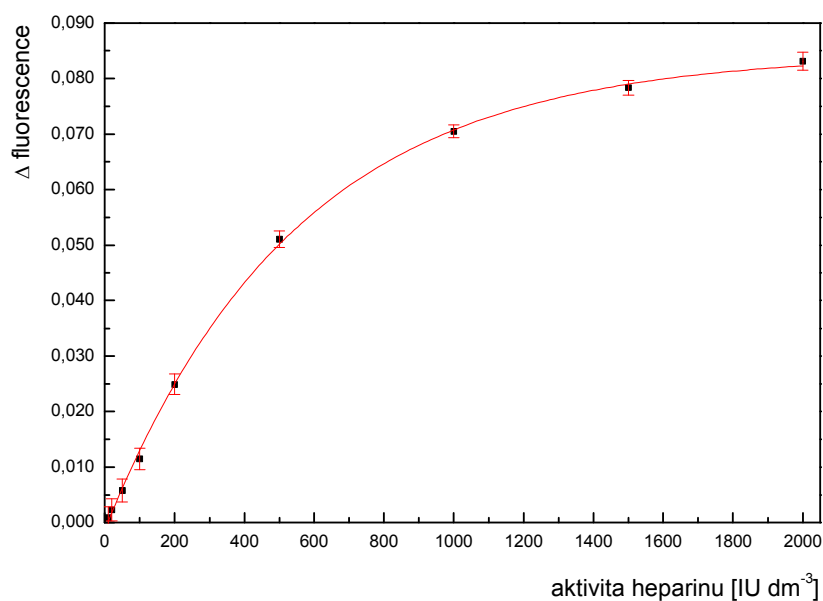
**Obr. 39:** Azur A – kalibrační závislost

$c_{\text{azur A}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{heparinu}} = 10 - 2000 \text{ IU dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 293 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 670 \text{ nm}$ ;  $l_{\text{MC}} = 150 \text{ cm}$  ( $\approx 300 \mu\text{l}$ );  $l_{\text{RC}} = 0 \text{ cm}$  (bez RC);  $V_{\text{azur A}} = 150 \mu\text{l}$ ;  $V_{\text{vzorku}} = 150 \mu\text{l}$ ;  $v_{\text{průtoku}} = 2500 \mu\text{l min}^{-1}$



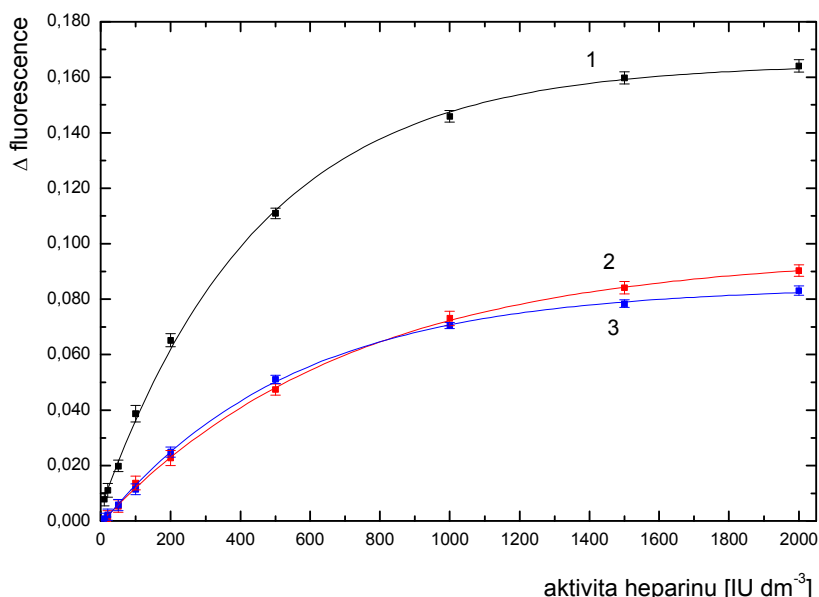
**Obr. 40:** Azur B – kalibrační závislost

$c_{\text{azur B}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{heparinu}} = 10 - 2000 \text{ IU dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 675 \text{ nm}$ ;  $l_{\text{MC}} = 150 \text{ cm}$  ( $\approx 300 \mu\text{l}$ );  $l_{\text{RC}} = 0 \text{ cm}$  (bez RC);  $V_{\text{azur B}} = 150 \mu\text{l}$ ;  $V_{\text{vzorku}} = 150 \mu\text{l}$ ;  $v_{\text{průtoku}} = 2500 \mu\text{l min}^{-1}$



**Obr. 41:** Methylenová modř – kalibrační závislost

$c_{\text{methylenové modři}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{heparinu}} = 10 - 2000 \text{ IU dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 297 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 687 \text{ nm}$ ;  $l_{\text{MC}} = 150 \text{ cm}$  ( $\approx 300 \mu\text{l}$ );  $l_{\text{RC}} = 0 \text{ cm}$  (bez RC);  $V_{\text{methylenové modři}} = 150 \mu\text{l}$ ;  $V_{\text{vzorku}} = 150 \mu\text{l}$ ;  $v_{\text{průtoku}} = 2500 \mu\text{l min}^{-1}$



**Obr. 42:** Kalibrační závislosti pro jednotlivá barviva – nosný roztok voda

1 – azur A; 2 – azur B; 3 – metylenová modř;  $c_{\text{barviva}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{heparinu}} = 10 - 2000 \text{ IU dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} \text{ aA} = 293 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} \text{ aA} = 670 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} \text{ aB} = 295 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} \text{ aB} = 675 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} \text{ mM} = 297 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} \text{ mM} = 687 \text{ nm}$ ;  $l_{\text{MC}} = 150 \text{ cm}$  ( $\approx 300 \mu\text{l}$ );  $l_{\text{RC}} = 0 \text{ cm}$  (bez RC);  $V_{\text{vzorku}} = 150 \mu\text{l}$ ;  $V_{\text{barviva}} = 150 \mu\text{l}$ ;  $v_{\text{průtoku}} = 2500 \mu\text{l min}^{-1}$

**Tab. 4:** Parametry kalibračních závislostí jednotlivých barviv – nosný roztok voda

barvivo	rovnice fitu $y = y_0 + A \exp(R_0 X)$	hodnota parametru	chyba parametru	korelační koeficient	použitelný rozsah [IU dm <sup>-3</sup> ]
azur A	$y_0$	0,16502	$\pm 0,00157$	0,99919	m. s. – 1200
	A	-0,16044	$\pm 0,00171$		
	$R_0$	-0,00221	$\pm 7,6 \times 10^{-5}$		
azur B	$y_0$	0,09616	$\pm 0,00134$	0,99921	m. s. – 1500
	A	-0,0969	$\pm 0,00125$		
	$R_0$	-0,0014	$\pm 5,9 \times 10^{-5}$		
metylenová modř	$y_0$	0,08451	$\pm 8,66 \times 10^{-4}$	0,9993	m. s. – 1500
	A	-0,08586	$\pm 8,97 \times 10^{-4}$		
	$R_0$	-0,00183	$\pm 6,23 \times 10^{-5}$		

Z předcházejícího je patrné, že barvivo azur A poskytuje největší směrnici. S jeho použitím tak bude stanovení heparinu nejcitlivější. Naopak nejméně citlivé bude stanovení s metylenovou modří. Hodnoty korelačních koeficientů jsou pro všechna barviva srovnatelné. Ze sledovaných barviv je však pro azur A dosaženo nejmenšího použitelného rozsahu, který je přibližně o 300 IU dm<sup>-3</sup> menší než s použitím barviva azur B nebo

methylenovou modří. Horní mez použitelného rozsahu je koncentrace heparinu, do které dochází ještě k relativně velkému nárůstu signálu. Dolní odpovídá mezi stanovitelnosti.

### 4.2.3. Charakteristiky SIA stanovení heparinu

Po proměření kalibračních závislostí byly určeny základní charakteristiky spektrofluorimetrického SIA stanovení heparinu s jednotlivými barvivy (varianta nosný roztok voda). Byla zjištěna opakovatelnost, mez detekce a mez stanovitelnosti.

Pro zjištění hodnot opakovatelnosti (tab. 5) byl za optimálních podmínek 10x za sebou proměřen signál slepého pokusu (blank) a 10x roztoku heparinu o aktivitě 500 IU dm<sup>-3</sup> (analýza). Dílčí opakovatelnosti jsou vyjádřeny jako relativní směrodatné odchylky výšek získaných píků. V případě opakovatelnosti výsledného rozdílového signálu jsou dílčí směrodatné odchylky zkombinovány a vztaženy k jeho velikosti.

Mez detekce a stanovitelnosti heparinu (tab. 6) byla určena z 10x po sobě proměřeného signálu blanku za optimálních podmínek. Trojnásobek (3σ) a desetinásobek (10σ) hodnoty směrodatné odchylky, určené z výšek píků, byl dosazen do rovnice příslušné kalibrační závislosti a přepočten na aktivitu heparinu v IU dm<sup>-3</sup>. Pro vyjádření meze detekce a stanovitelnosti heparinu v mg dm<sup>-3</sup> byl zvolen přepočet, kdy 130 IU odpovídá 1 mg (standard definovaný WHO).

**Tab. 5:** Opakovatelnost stanovení pro jednotlivá barviva – nosný roztok voda

barvivo	opakovatelnost [% RSD]		
	blank	analýza	rozdílový signál
azur A	1,22	1,90	4,86
azur B	1,10	1,72	4,30
methylenová modř	1,07	1,10	3,07

**Tab. 6:** Mez detekce a stanovitelnosti pro jednotlivá barviva – nosný roztok voda

barvivo	mez detekce		mez stanovitelnosti	
	[IU dm <sup>-3</sup> ]	[mg dm <sup>-3</sup> ]	[IU dm <sup>-3</sup> ]	[mg dm <sup>-3</sup> ]
azur A	7,6	0,058	58,8	0,452
azur B	39,1	0,301	124,5	0,958
methylenová modř	32,3	0,248	91,8	0,706

Stanovení s barvivem azur A je sice nejcitlivější, ale zároveň také nejméně opakovatelné, jak vyplývá z tabulky 5. Nejvyšší opakovatelnosti všech signálů je dosaženo pro methylenovou modř, pro kterou je naopak stanovení nejméně citlivé. S použitím barviva azur A je dále dosaženo nejnižší hodnoty meze detekce a stanovitelnosti (tab. 6).

Doba jednoho měření, tedy čas, který uplyne od zmáčknutí tlačítka start v ovládacím software do detekce píku, v tomto průtokovém uspořádání za optimálních podmínek, trvá 1 minutu a 50 vteřin. Objem odpadu pro jedno měření činí 1400  $\mu\text{l}$ .

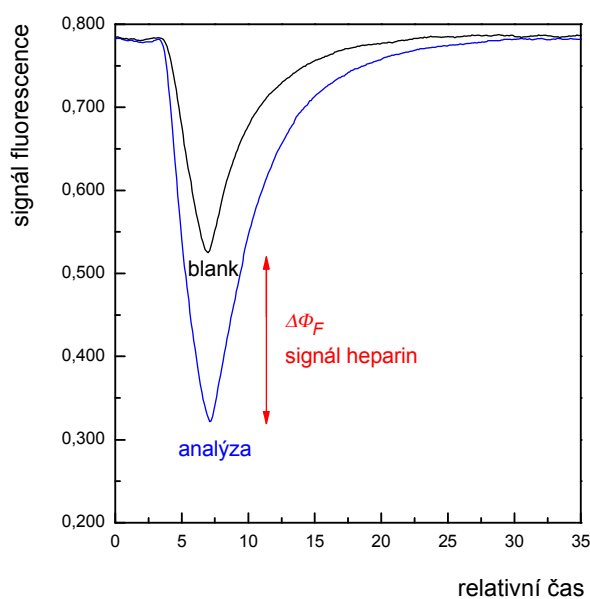
#### **4.2.4. Stanovení vzorku práškového heparinu**

Vypracované stanovení heparinu bylo s použitím barviva azur A otestováno na reálném vzorku práškového heparinu o aktivitě  $110 \text{ IU mg}^{-1}$ . Ze zásobního roztoku o koncentraci  $100 \text{ mg dm}^{-3}$  byl připraven zkušební roztok vzorku o koncentraci  $5 \text{ mg dm}^{-3}$  (aktivita  $550 \text{ IU dm}^{-3}$ ). Signál tohoto roztoku byl proměřen  $5x$  a získané hodnoty byly přes kalibrační závislost přepočteny na aktivitu heparinu. Z výsledků měření byla určena střední hodnota aktivity vzorku práškového heparinu, která byla porovnána s očekávanou hodnotou. Relativní směrodatná odchylka vztažená k očekávané hodnotě byla 5,37 %.

### 4.3. Spektrofluorimetrické SIA stanovení heparinu, nosný roztok barvivo

V tomto průtokovém uspořádání byla deionizovaná voda, která byla nosným roztokem v předchozí variantě stanovení, nahrazena roztokem fenothiazinového barviva (obr. 12). Fyzická konfigurace SIA aparatury tedy zůstala oproti předchozím měřením nezměněna. Jak již bylo zmíněno, odlišnost spočívá v tom, že do nosného roztoku barviva je dávkována pouze reakční zóna heparinu (analýza) nebo deionizované vody (blank). Za tímto účelem byly provedeny i změny v ovládacím software, kde byl vynechán krok dávkování barviva. Při průchodu nadávkované reakční zóny heparinu (deionizované vody) detektorem, jsou v této variantě SIA stanovení získávány negativní píky, u kterých je vyhodnocována jejich výška.

Pokles fluorescence oproti základní linii barviva je způsoben dvěma faktory; jednak samotným naředěním barviva vodou (rozpuštědlem) z analyzovaného roztoku heparinu a jednak vznikem iontového asociátu heparin-barvivo. Pro určení signálu, který přísluší pouze množství heparinu, obsaženém ve vzorku  $\Delta\Phi_F$ , je tedy opět nutné provádět dvě měření. Jedno s deionizovanou vodou pro odečtení blanku a druhé s analyzovaným roztokem heparinu  $\Delta\Phi_F = \Phi_{F, \text{barvivo+heparin v rozpouštědle (analýza)}} - \Phi_{F, \text{barvivo+rozpuštědlo (blank)}}$ , jak je pro názornost ukázáno na obrázku 43.



**Obr. 43:** Princip stanovení heparinu – nosný roztok barvivo



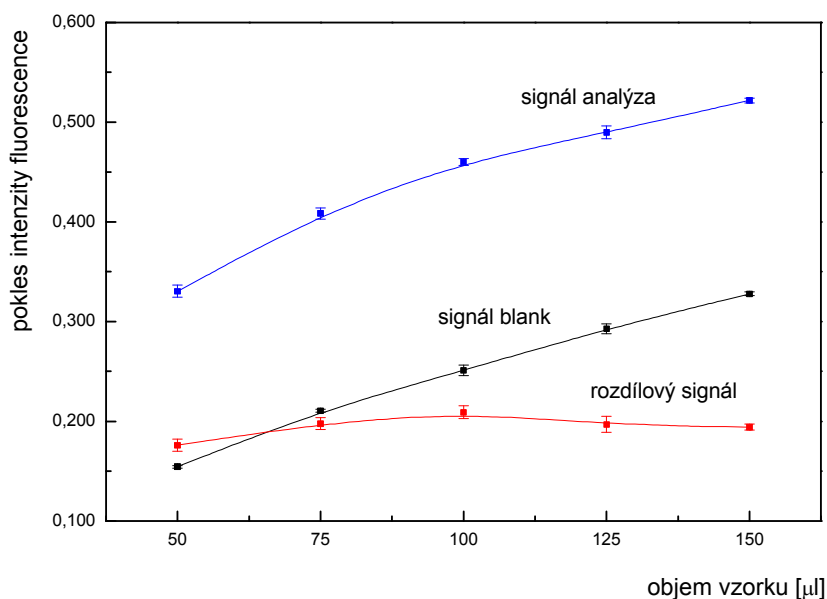
### 4.3.1. Optimalizace spektrofluorimetrického stanovení heparinu

Stejně tak jako v předchozím způsobu stanovení, byly jako signál vyhodnocovány výšky a dále tvary získaných píků v závislosti na měnících se hodnotách sledovaných parametrů. Posuzována byla také časová náročnost analýz a spotřeba reagentů. Vzhledem k takřka identickému chování jednotlivých barviv v předchozích měřeních bylo pro tento způsob stanovení zvoleno azur A jako modelové barvivo.

Optimalizován byl vliv dávkovaného objemu vzorku, délky reakční cívky, průtokové rychlosti a koncentrace barviva. Měření opět probíhala při vlnových délkách maxima emise a excitace barviva azur A a koncentraci heparinu  $500 \text{ IU dm}^{-3}$ . Výchozí parametry experimentálních podmínek pro optimalizační měření byly zvoleny stejně jako v případě, kdy byla nosným roztokem deionizovaná voda (kapitola 4.2.1). Proměřené závislosti byly pro každý parametr vyneseny do grafů, znázorňujících fluorescenční signály odpovídající výškám detekovaných píků pro analýzu a blank a dále jejich rozdíl. Pod grafem každé závislosti jsou uváděny příslušné experimentální podmínky.

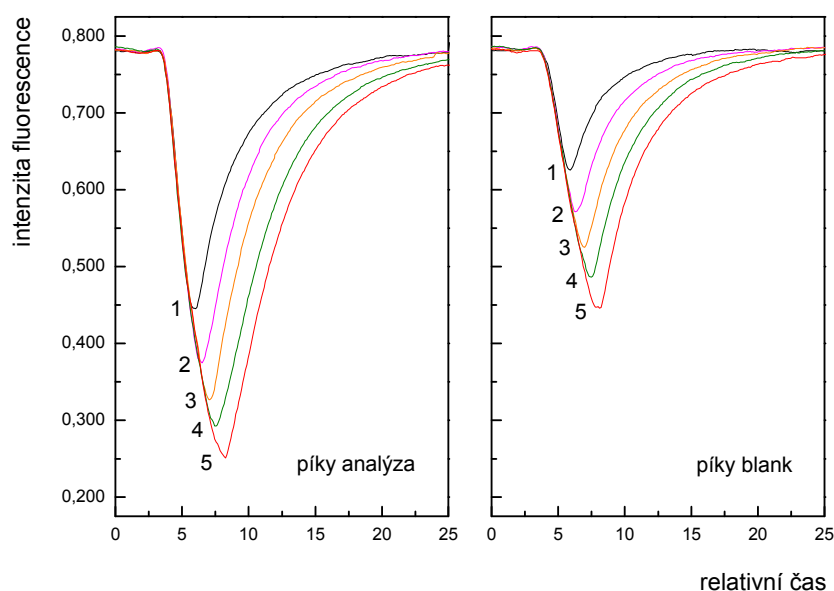
#### 4.3.1.1. Vliv dávkovaného objemu vzorku

Jako první byl v tomto modifikovaném uspořádání optimalizován dávkovaný objem heparinu, který byl sledován v rozmezí  $50 - 150 \mu\text{l}$  s krokem  $25 \mu\text{l}$ . Graf znázorňující signály, dosažené v závislosti na dávkovaném objemu vzorku, je uveden na obrázku 44.



**Obr. 44:** Azur A – vliv dávkovaného objemu vzorku

$c_{\text{azur A}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{heparinu}} = 500 \text{ IU dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 293 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 670 \text{ nm}$ ;  $l_{\text{MC}} = 150 \text{ cm}$  ( $\approx 300 \mu\text{l}$ );  $l_{\text{RC}} = 75 \text{ cm}$  ( $\approx 150 \mu\text{l}$ );  $V_{\text{vzorku}} = 50 - 150 \mu\text{l}$ ;  $v_{\text{průtoku}} = 2500 \mu\text{l min}^{-1}$



**Obr. 45:** Azur A – vliv dávkovaného objemu vzorku (píky pro analýzu a blank)

$V_{\text{vzorku}}$  1 – 50; 2 – 75; 3 – 100; 4 – 125; 5 – 150  $\mu\text{l}$

Z proměřených závislostí (obr. 44) a tvarů získaných píků (obr. 45) je patrné, že rostoucí objem dávkovaného roztoku heparinu (signál analýza) má za následek zvyšující se pokles intenzity fluorescence oproti základní linii. Vlivem pouze zvyšujícího se naředění nosného roztoku barviva deionizovanou vodou, s jejím rostoucím dávkovaným objemem, dochází k nárůstu signálu blanku, který je lineární v rozsahu 75 – 150  $\mu\text{l}$ . Výsledný rozdílový signál, příslušející pouze heparinu, se zvyšuje do hodnoty dávkovaného objemu 100  $\mu\text{l}$ , projde maximem a potom se opět nepatrně snižuje.

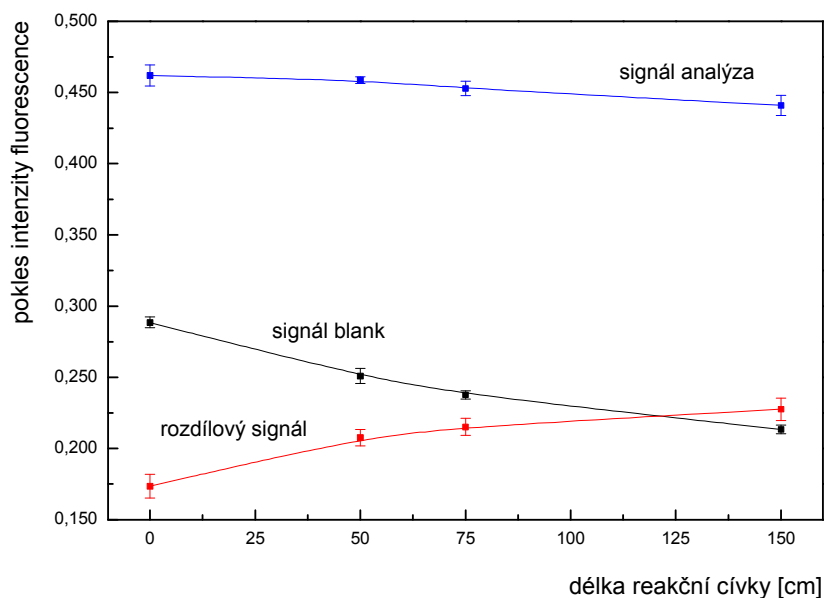
S přihlédnutím ke tvaru dosažených píků (obr. 45) byl jako optimální zvolen dávkovaný objem 100  $\mu\text{l}$ , který je kompromisem mezi výškou píku a jeho rozmytím v čase. Z důvodu lepší průchodnosti průtokového SIA systému byl dosud používaný objem mísící cívky 300  $\mu\text{l}$  pro všechna další měření nahrazen cívkou o objemu 100  $\mu\text{l}$ .

#### 4.3.1.2. Vliv délky (objemu) reakční cívky

Pro posouzení vlivu tohoto parametru byly použity stejné reakční cívky jako v předchozích měřeních, tedy délek 50, 75 a 150 cm (odpovídající objemy jsou přibližně 100, 150 a 300  $\mu\text{l}$ ).

Z optimalizačního grafu (obr. 46), lze pozorovat, že s rostoucí délkou reakční cívky dochází jen k nepatrnému poklesu výšek píků pro případ interakce s heparinem (signál analýza). Signál blanku je nejvyšší pro průtokový systém bez použití reakční cívky. S její rostoucí délkou nastává výraznější rozmývání zóny deionizované vody (blanku) a výšky

detekovaných píků klesají. Z toho důvodu velikost rozdílového signálu, odpovídající pouze množství heparinu, roste se zvyšující se délkou reakční cívky. Na základě kompromisu, mezi co největší hodnotou rozdílového signálu a co nejmenším rozmytím píků, byla jako optimální vybrána reakční cívka o délce 50 cm, která byla použita pro další měření.



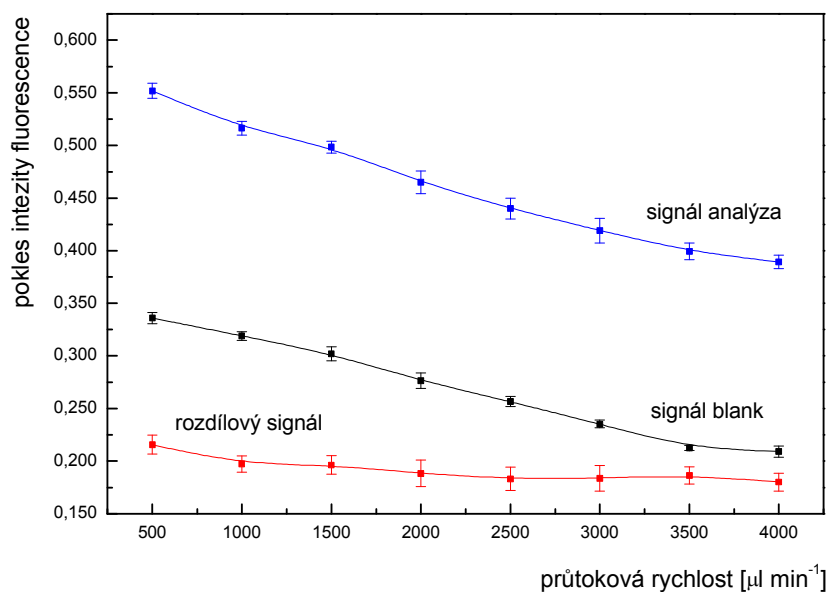
**Obr. 46:** Azur A – vliv délky reakční cívky

$c_{azur A} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_{heparinu} = 500 \text{ IU dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{ex} = 293 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{em} = 670 \text{ nm}$ ;  $l_{MC} = 50 \text{ cm} (\approx 100 \mu\text{l})$ ;  $l_{RC} = 0 - 150 \text{ cm} (\approx 0 - 300 \mu\text{l})$ ;  $V_{vzorku} = 100 \mu\text{l}$ ,  $v_{průtoku} = 2500 \mu\text{l min}^{-1}$

#### 4.3.1.3. Vliv průtokové rychlosti

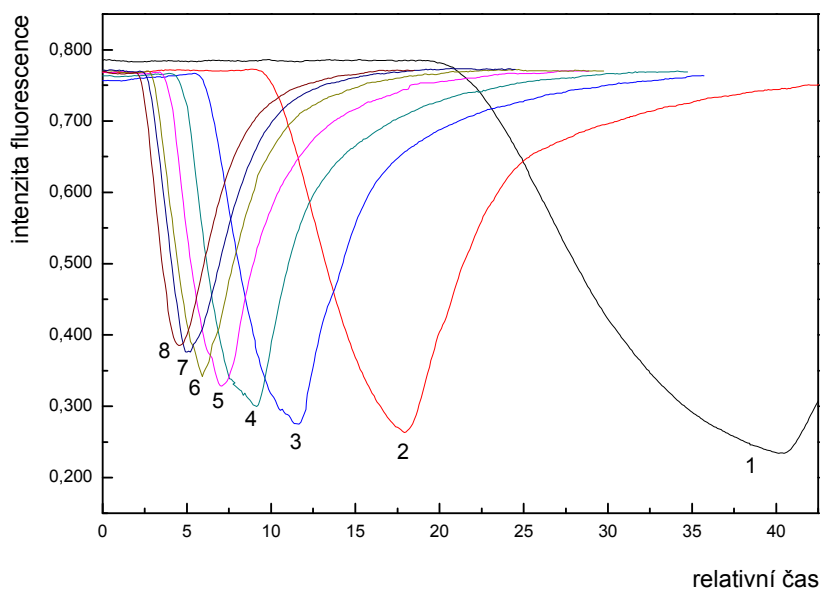
Vliv průtokové rychlosti transportu reakčních zón do detektoru byl sledován v rozmezí  $500 - 4000 \mu\text{l min}^{-1}$  při velikosti kroku  $500 \mu\text{l min}^{-1}$ . Měření byla prováděna za experimentálních podmínek uvedených pod grafem nalezené závislosti (obr. 47). Sledovány byly opět výšky píků dosažené, jak pro měření s heparinem (signál analýza), tak s deionizovanou vodou (signál blank).

Z optimalizačního grafu, který je znázorněn na následujícím obrázku 47, je patrný přibližně lineární pokles výšek píků dosažených pro analýzu s rostoucí průtokovou rychlostí. Se stejnou směrnici klesají i píky změřené pro blank. Výsledný rozdílový signál se proto s rostoucí průtokovou rychlostí v podstatě nemění.



**Obr. 47:** Azur A – vliv průtokové rychlosti nosného proudu

$c_{\text{azur A}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{heparinu}} = 500 \text{ IU dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 293 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 670 \text{ nm}$ ;  $l_{\text{MC}} = 50 \text{ cm}$  ( $\approx 100 \mu\text{l}$ );  $l_{\text{RC}} = 50 \text{ cm}$  ( $\approx 100 \mu\text{l}$ );  $V_{\text{vzorku}} = 100 \mu\text{l}$ ;  $v_{\text{průtoku}} = 500 - 4000 \mu\text{l min}^{-1}$



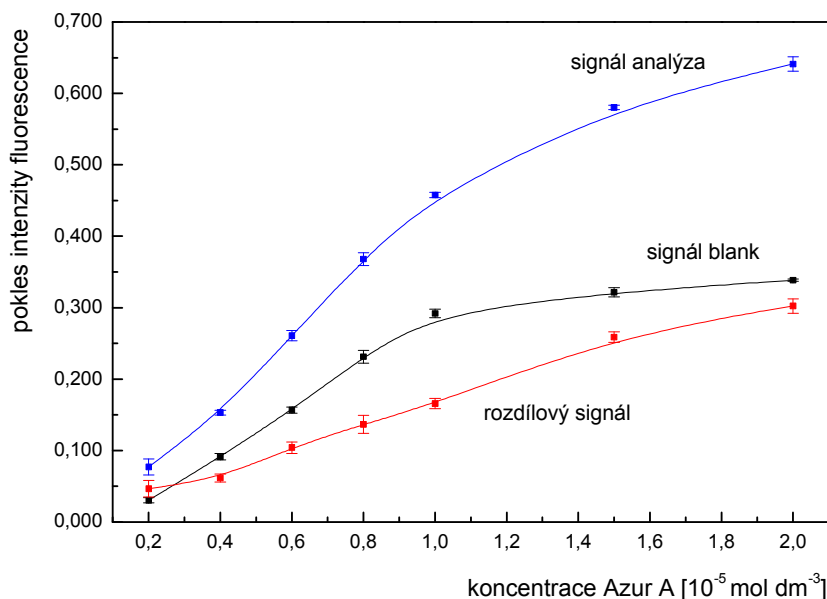
**Obr. 48:** Azur A – vliv průtokové rychlosti nosného proudu (píky pro analýzu)

$v_{\text{průtoku}}$  **1** – 500; **2** – 1000; **3** – 1500; **4** – 2000; **5** – 2500; **6** – 3000; **7** – 3500; **8** – 4000  $\mu\text{l min}^{-1}$ ;  
 $c_{\text{azur A}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{heparinu}} = 500 \text{ IU dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 293 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 670 \text{ nm}$ ;  $l_{\text{MC}} = 50 \text{ cm}$  ( $\approx 100 \mu\text{l}$ );  
 $l_{\text{RC}} = 50 \text{ cm}$  ( $\approx 100 \mu\text{l}$ );  $V_{\text{vzorku}} = 100 \mu\text{l}$ ;

Po posouzení tvarů detekovaných píků, získaných pro měření s roztokem heparinu (analýza), uvedených na obrázku 48, byla jako optimální průtoková rychlost zvolena hodnota 3000  $\mu\text{l min}^{-1}$ , která je kompromisem mezi co nejmenší časovou náročností jedné analýzy, dosaženou výškou píku a jeho rozmytím. Hodnota nalezené optimální rychlosti byla použita pro všechna další měření.

#### 4.3.1.4. Vliv koncentrace fenothiazinového barviva

Posledním optimalizovaným parametrem byl pro tento způsob stanovení vliv koncentrace fenothiazinového barviva na velikost dosažených signálů. Koncentrace použitého modelového barviva (azur A) byla měněna v rozmezí  $(0,2 - 2,0) \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ . Průběh závislostí nalezených pro analýzu, blank a jejich rozdílový signál je znázorněn na následujícím obrázku 49.



**Obr. 49:** Azur A – vliv koncentrace barviva na intenzitu fluorescence

$c_{\text{azur A}} = (0,2 - 2,0) \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{heparinu}} = 500 \text{ IU dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 293 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 670 \text{ nm}$ ;  $l_{\text{MC}} = 50 \text{ cm}$  ( $\approx 100 \mu\text{l}$ );  $l_{\text{RC}} = 50 \text{ cm}$  ( $\approx 100 \mu\text{l}$ );  $V_{\text{vzorku}} = 100 \mu\text{l}$ ;  $v_{\text{průtoku}} = 3000 \mu\text{l min}^{-1}$

Z optimalizačního grafu je patrné, že s rostoucí koncentrací azur A hodnoty všech signálů stoupají. Nárůst výšek píků jak pro analýzu, tak pro blank je lineární v rozmezí  $(0,2 - 1,0) \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ . Velikost rozdílového signálu roste lineárně v celém sledovaném rozsahu. Z důvodu posunu emisních maxim ve fluorescenčních spektrech barviv (viz kapitola 4.1.2) lze jako nejvyšší možnou koncentraci barviva použít hodnotu  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , která byla zároveň zvolena jako optimální.

#### 4.3.1.5. Optimální podmínky stanovení heparinu – nosný roztok barvivo

Pro dosažení maximální citlivosti a frekvence analýz spektrofotometrického SIA stanovení heparinu reakcí s fenothiazinovým barvivem, které je v tomto průtokovém uspořádání zvoleno jako nosný roztok, je vhodné volit nalezené optimální podmínky, souhrnně uvedené v následující tabulce 7.

**Tab. 7:** Optimální podmínky spektrofotometrického SIA stanovení heparinu – nosný roztok barvivo

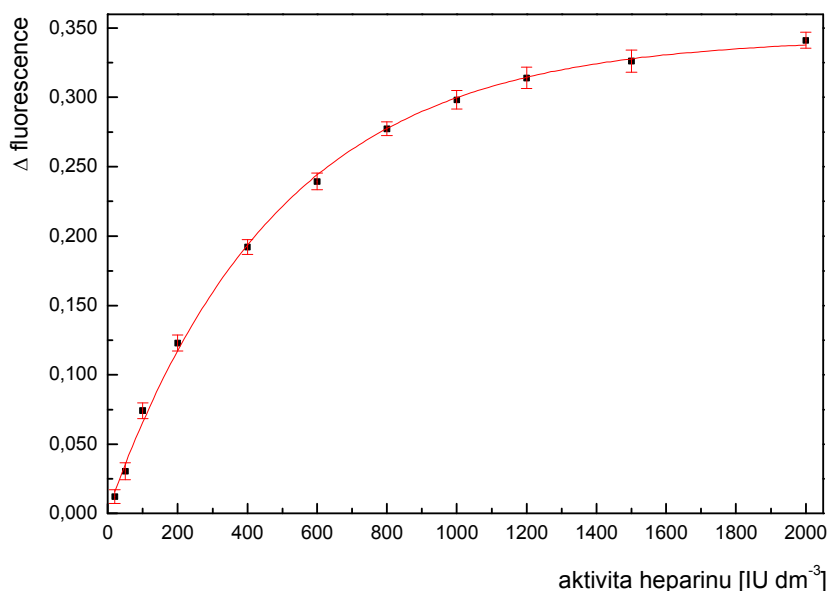
parametr SIA stanovení:	vybraná hodnota		
délka (objem) mísící cívky [cm] ( $\approx \mu\text{l}$ )	50 (100)		
délka (objem) reakční cívky [cm] ( $\approx \mu\text{l}$ )	50 (100)		
koncentrace barviva [ $\text{mol dm}^{-3}$ ]	$1 \times 10^{-5}$		
dávkovaný objem vzorku [ $\mu\text{l}$ ]	100		
průtoková rychlost detektor [ $\mu\text{l min}^{-1}$ ]	3000		
rychlost nasávání nosného roztoku [ $\mu\text{l min}^{-1}$ ]	4500 – 5000		
rychlost dávkování činidel [ $\mu\text{l min}^{-1}$ ]	1000		
	azur A	azur B	methyl. modř
excitační vlnová délka [nm]	293	295	297
emisní vlnová délka [nm]	670	675	687

### 4.3.2. Kalibrační závislosti – nosný roztok barvivo

Za nalezených optimálních podmínek (tabulka 7) byly, i pro toto modifikované stanovení heparinu se spektrofluorimetrickou detekcí, proměřeny kalibrační závislosti pro všechna sledovaná barviva. Kalibrační závislosti byly proměřovány v koncentračním rozsahu heparinu 20 – 2000 IU dm<sup>-3</sup>, při vlnových délkách excitačních a emisních maxim jednotlivých barviv.

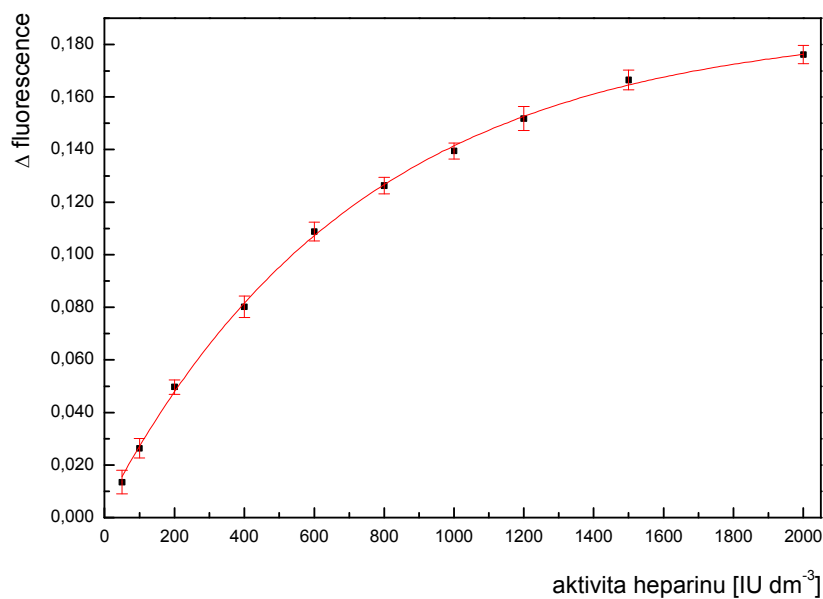
Pro každý bod kalibrační závislosti bylo stejně jako v předchozím stanovení provedeno vždy 5 měření. Od střední hodnoty výšek píků, dosažených pro jednotlivé koncentrace heparinu, byla vždy odečtena střední hodnota signálu blanku, který byl proměřen také 5x. Takto získané hodnoty rozdílových signálů byly statisticky vyhodnoceny a vyneseny do grafů kalibračních závislostí stanovení heparinu s jednotlivými barvivy, jejichž průběh je znázorněn na následujících obr. 50 (azur A), 51 (azur B) a 52 (methylenová modř). Pro možnost vzájemného porovnání jsou navíc kalibrační závislosti vyneseny společně do jednoho grafu (obr. 53).

I v tomto případě mají kalibrační závislosti v celém sledovaném rozsahu exponenciální průběh. Z toho důvodu bylo stejně jako v minulém stanovení použito proložení exponenciální funkcí. Parametry regresních křivek včetně hodnot jejich korelačních koeficientů a použitelných dynamických rozsahů jsou uvedeny v tabulce 8.



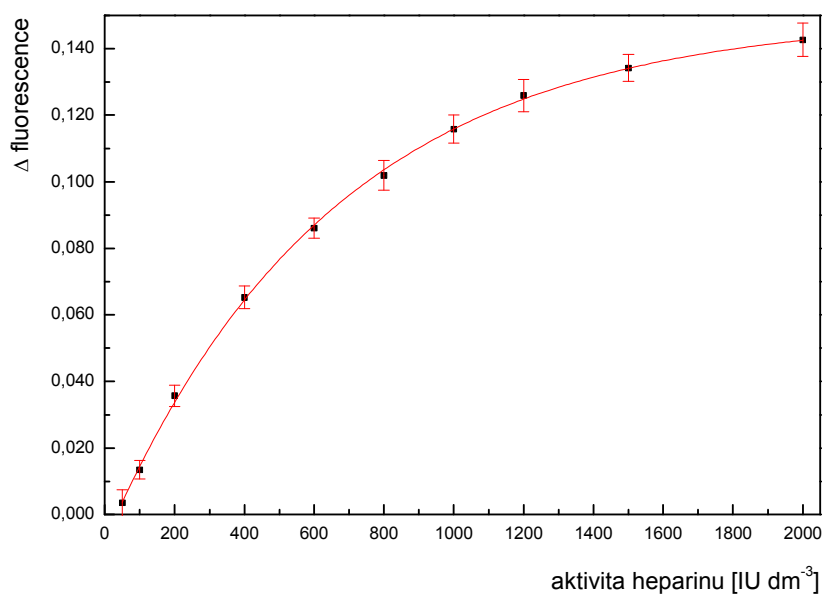
**Obr. 50:** Azur A – kalibrační závislost

$c_{\text{azur A}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{heparinu}} = 20 - 2000 \text{ IU dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 293 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 670 \text{ nm}$ ;  $l_{\text{MC}} = 50 \text{ cm}$  ( $\approx 100 \mu\text{l}$ );  
 $l_{\text{RC}} = 50 \text{ cm}$  ( $\approx 100 \mu\text{l}$ );  $V_{\text{vzorku}} = 100 \mu\text{l}$ ;  $v_{\text{průtoku}} = 3000 \mu\text{l min}^{-1}$



**Obr. 51:** Azur B – kalibrační závislost

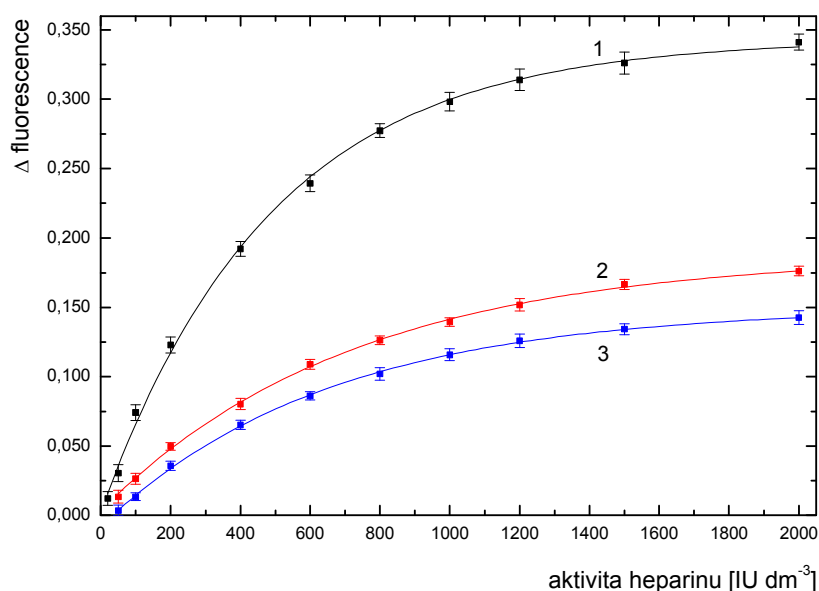
$c_{\text{azur B}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{heparinu}} = 50 - 2000 \text{ IU dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 675 \text{ nm}$ ;  $l_{\text{MC}} = 50 \text{ cm}$  ( $\approx 100 \mu\text{l}$ );  $l_{\text{RC}} = 50 \text{ cm}$  ( $\approx 100 \mu\text{l}$ );  $V_{\text{vzorku}} = 100 \mu\text{l}$ ;  $v_{\text{průtoku}} = 3000 \mu\text{l min}^{-1}$



**Obr. 52:** Methylenová modř – kalibrační závislost

$c_{\text{methylenové modři}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{heparinu}} = 50 - 2000 \text{ IU dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 297 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 687 \text{ nm}$ ;  $l_{\text{MC}} = 50 \text{ cm}$  ( $\approx 100 \mu\text{l}$ );  $l_{\text{RC}} = 50 \text{ cm}$  ( $\approx 100 \mu\text{l}$ );  $V_{\text{vzorku}} = 100 \mu\text{l}$ ;  $v_{\text{průtoku}} = 3000 \mu\text{l min}^{-1}$





**Obr. 53:** Kalibrační závislosti pro jednotlivá barviva – nosný roztok barvivo

1 – azur A; 2 – azur B; 3 – metylenová modř;  $c_{\text{barvivo}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{heparinu}} = 20 - 2000 \text{ IU dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} \text{ aA} = 293 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} \text{ aA} = 670 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} \text{ aB} = 295 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} \text{ aB} = 675 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} \text{ mM} = 297 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} \text{ mM} = 687 \text{ nm}$ ;  $l_{\text{MC}} = 50 \text{ cm} (\approx 100 \mu\text{l})$ ;  $l_{\text{RC}} = 50 \text{ cm} (\approx 100 \mu\text{l})$ ;  $V_{\text{vzorku}} = 100 \mu\text{l}$ ;  $v_{\text{průtoku}} = 3000 \mu\text{l min}^{-1}$

**Tab. 8:** Parametry kalibračních závislostí jednotlivých barviv – nosný roztok barvivo

barvivo	rovnice fitu $y = y_0 + A \exp(R_0 X)$	hodnota parametru	chyba parametru	korelační koeficient	použitelný rozsah [IU dm <sup>-3</sup> ]
azur A	$y_0$	0,34338	$\pm 0,0045$	0,9984	m. s. – 1200
	A	-0,34121	$\pm 0,00469$		
	$R_0$	-0,00206	$\pm 8,3 \times 10^{-5}$		
azur B	$y_0$	0,18785	$\pm 0,00257$	0,99899	m. s. – 1500
	A	-0,18449	$\pm 0,00229$		
	$R_0$	-0,00138	$\pm 5,2 \times 10^{-5}$		
metylenová modř	$y_0$	0,14983	$\pm 0,00186$	0,99932	m. s. – 1200
	A	-0,1578	$\pm 0,00166$		
	$R_0$	-0,00153	$\pm 4,8 \times 10^{-5}$		

Z parametrů kalibračních závislostí stanovení heparinu s jednotlivými barvivy je vidět, že s azur A je i v této variantě průtokového uspořádání dosaženo největší směrnice. Stejně jako v předchozích kalibračních závislostech poskytuje nejmenší směrnici metylenová modř. Hodnoty korelačních koeficientů naopak s klesajícím poskytovaným

signálem rostou. Horní mez použitelného dynamického rozsahu stanovení heparinu s azur A a azur B je při tomto uspořádání stejná jako v případě, kdy je nosným roztokem deionizovaná voda. Pro methylenovou modř je tato hodnota nižší.

### 4.3.3. Charakteristiky SIA stanovení heparinu

Po proměření kalibračních závislostí byly určeny základní charakteristiky SIA stanovení heparinu s jednotlivými barvivy (varianta nosný roztok barvivo). Stejným způsobem jako v předchozí variantě stanovení byla za optimálních podmínek uvedených v kapitole 4.3.1.5 zjištěna opakovatelnost (tabulka 9), mez detekce a mez stanovitelnosti (tabulka 10).

**Tab. 9:** Opakovatelnost stanovení pro jednotlivá barviva – nosný roztok barvivo

barvivo	opakovatelnost [% RSD]		
	blank	analýza	rozdílový signál
azur A	2,06	1,56	4,63
azur B	2,44	1,91	5,66
methylenová modř	2,14	1,22	4,51

**Tab. 10:** Mez detekce a stanovitelnosti pro jednotlivá barviva – nosný roztok barvivo

barvivo	mez detekce		mez stanovitelnosti	
	[IU dm <sup>-3</sup> ]	[mg dm <sup>-3</sup> ]	[IU dm <sup>-3</sup> ]	[mg dm <sup>-3</sup> ]
azur A	20,4	0,157	80,1	0,616
azur B	21,3	0,164	108,3	0,833
methylenová modř	62,8	0,483	135,8	1,045

Z výše uvedeného je patrné, že hodnoty opakovatelností pro stanovení heparinu s jednotlivými barvivy jsou si vzájemně velmi podobné. Horší opakovatelnosti (tedy větší RSD) oproti zbývajícím dvou barvivům je dosaženo s barvivem azur B.

Nejnižší hodnoty meze detekce a stanovitelnosti je dosaženo pro barvivo azur A. S použitím methylenové modři jsou hodnoty meze detekce a stanovitelnosti nejvyšší, tedy nejméně vhodné. Z důvodu nelineárního průběhu kalibračních závislostí zde neplatí pravidlo, že mez detekce přibližně odpovídá jedné třetině meze stanovitelnosti.

Čas potřebný k provedení jednoho měření je v tomto „převráceném“ průtokovém uspořádání 1 minuta a 25 vteřin (za nastavených optimálních podmínek). Objem odpadu pro jedno měření činí 1200  $\mu\text{l}$ .

#### **4.3.4. Stanovení vzorku práškového heparinu**

I pro toto vypracované stanovení heparinu bylo s použitím barviva azur A, za kterého je dosaženo nejvyšší citlivosti, provedeno otestování na reálném vzorku práškového heparinu o aktivitě  $110 \text{ IU mg}^{-1}$ . Ze zásobního roztoku o koncentraci  $100 \text{ mg dm}^{-3}$  byl opět připraven roztok vzorku o koncentraci  $5 \text{ mg dm}^{-3}$  (aktivitě  $550 \text{ IU dm}^{-3}$ ), jehož signál byl proměřen 5x. Výšky detekovaných píků byly dosazeny do kalibrační závislosti pro azur A a přepočteny na aktivitu heparinu. Nalezená střední hodnota aktivity byla porovnána s očekávanou hodnotou a výsledná odchylka byla 6,23 %.

## 4.4. Porovnání průtokových stanovení heparinu

Parametry vypracovaných SIA stanovení heparinu reakcí s fenothiazinovými barvivy a spektrofluorimetrickou detekcí byly porovnány s výsledky dosaženými v dizertační práci M. Havelcové<sup>49</sup>, kde byl heparin stanovován stejnou reakcí, ale za využití techniky FIA a spektrofotometrické detekce. Následující tabulka 11 porovnává meze detekce, stanovitelnosti a použitelný dynamický rozsah pro jednotlivé metody a použitá barviva.

**Tab. 11:** Srovnání parametrů dvou variant spektrofluorimetrického SIA stanovení heparinu s výchozím spektrofotometrickým FIA stanovením

barvivo	mez detekce		mez stanovitelnosti		použitelný rozsah [IU dm <sup>-3</sup> ]
	[IU dm <sup>-3</sup> ]	[mg dm <sup>-3</sup> ]	[IU dm <sup>-3</sup> ]	[mg dm <sup>-3</sup> ]	
<i>Spektrofluorimetrické SIA stanovení – nosný roztok voda</i>					
azur A	7,6	0,058	58,8	0,452	m. s. – 1200
azur B	39,1	0,301	124,5	0,958	m. s. – 1500
methylen. modř	32,3	0,248	91,8	0,706	m. s. – 1500
<i>Spektrofluorimetrické SIA stanovení – nosný roztok barvivo</i>					
azur A	20,4	0,157	80,1	0,616	m. s. – 1200
azur B	21,3	0,164	108,3	0,833	m. s. – 1500
methylen. modř	62,8	0,483	135,8	1,045	m. s. – 1200
<i>Spektrofotometrické FIA stanovení<sup>49</sup> – nosný roztok barvivo</i>					
azur A	47,0	0,362	135	1,038	0 – 5000
azur B	46,5	0,358	145	1,115	0 – 5000
methylen. modř	49,5	0,381	150	1,154	0 – 6250

Z výše uvedené tabulky vyplývá, že při obou variantách spektrofluorimetrického SIA stanovení je oproti stanovení FIA se spektrofotometrickou detekcí ve většině případů dosaženo nižších hodnot meze detekce a stanovitelnosti. Při spektrofotometrickém stanovení jsou pro všechna barviva meze detekce a stanovitelnosti srovnatelné.

Použitelný dynamický rozsah kalibrace pro jednotlivá barviva je naopak u SIA stanovení využívajících spektrofluorimetrickou detekci výrazně menší než lineární dynamický rozsah kalibrace při spektrofotometrickém FIA stanovení, pravděpodobně díky

exponenciálnímu tvaru kalibračních závislostí. Dalším porovnáváním bylo zjištěno, že stejně jako při spektrofluorimetrické detekci je, i v případě FIA se spektrofotometrickou detekcí, nejvyšší citlivosti stanovení heparinu dosaženo pro barvivo azur A.

## 4.5. Spektrofotometrické SIA stanovení heparinu

Pro případ spektrofotometrického SIA stanovení heparinu byla realizována možnost využití kompaktního spektrometru HR4000 s externím světelným zdrojem a optickými vlákny jako detektoru pro průtokové monitorování tvorby iontových asociátů fenothiazinových barviv s heparinem. Vláknem, vedoucí od zdroje záření, bylo připojeno k detekční „Z“ cele a druhé vlákno spojovalo celu a spektrometr, jak je ukázáno na obrázku 13 v experimentální části.

Během experimentů byly vyzkoušeny dva dostupné UV-VIS zdroje záření od společnosti Ocean Optics. Jednak to byl zdroj USB-DT Deuterium Tungsten Halogen (5 V; 1,5 A) a jednak zdroj DT-MINI-2-GS Mini Deuterium Tungsten Halogen (12 V; 0,35 A). U obou těchto zdrojů se ukázalo, že jejich výkon je příliš slabý na to, aby generované záření prošlo detekčním prostorem cely (tloušťka 1 cm) s dostatečnou intenzitou. Nepomohlo ani zvýšení citlivosti spektrometru nastavením vyšší hodnoty integračního času. Při velkých hodnotách integračních časů (od 200 ms) nastalo mírné zlepšení ve velikosti intenzity detekovaného záření. Přesto však bylo toto nastavení pro průtoková měření změn absorbance nevhodné z důvodu nedostatečné časové odezvy.

Z důvodu nemožnosti použití dostupných zdrojů záření bylo přistoupeno k pokusu o vytvoření vlastního světelného zdroje o potřebné intenzitě a dostatečné stabilitě. Nejprve byly testovány laserové diody (650 nm s optikou) s výstupním výkonem 1 mW a 5 mW, připojené ke zkonstruovanému stabilizačnímu zařízení (kapitola 3.3.3). Výsledkem experimentu však bylo zjištění, že spektrální interval laserové diody je příliš úzký a díky velké intenzitě záření není příslušná vlnová délka stabilní pro detekci. Dále na řadu přišly červené LED diody s výkonem 1 W. Testované kusy po fixaci v detekční cele, již poskytovaly dostatečnou intenzitu záření a široký spektrální interval zahrnující maxima absorbance všech používaných barviv. Detekované píky však byly velmi „zašuměné“ a zároveň docházelo ke značné dlouhodobé nereprodukovatelnosti dosažených výsledků měření výšek píků, při zachování stejných parametrů průtokového stanovení. Další komplikací bylo velké zahřívání diod. Z časových důvodů bylo od dalších experimentů v rámci pokusu o vytvoření světelného zdroje upuštěno a spektrofotometrická detekce v SIA stanovení heparinu nebyla realizována.

## 5. ZÁVĚR

Cílem předkládané diplomové práce bylo vypracovat stanovení heparinu technikou sekvenční injekční analýzy s využitím spektrofluorimetrické a spektrofotometrické detekce a dosažené výsledky porovnat se spektrofotometrickým FIA stanovením<sup>49</sup>. Principem obou stanovení je interakce heparinu s fenothiazinovým barvivem, při které dochází ke vzniku iontového asociátu heparin-barvivo. V případě spektrofluorimetrické detekce heparin potlačuje fluorescenci fenothiazinového barviva, kdy největšího poklesu je dosaženo při vlnové délce maxima emise. Pro případ spektrofotometrické detekce klesá vlivem vzniku iontového asociátu absorbance barviva v jeho absorpčním maximu. Jako uvažovaná fenothiazinová barviva byla pro stanovení heparinu vybrána methylenová modř, azur A a azur B.

V první části diplomové práce byly v rámci statických měření nalezeny vlnové délky excitačních a emisních maxim jednotlivých barviv. Dále byl studován vliv pH na velikost poklesu fluorescence barviva při interakci s heparinem, přičemž se ukázalo, že jakákoliv stabilizace pH má negativní dopad na dosažený analytický signál (pokles fluorescence). Z fluorescenčních spekter roztoků barviv s různým obsahem heparinu byly získány statické kalibrační závislosti mající exponenciální průběh. Nejvyšší citlivosti stanovení a použitelného dynamického rozsahu kalibrace bylo dosaženo pro azur A.

Předmětem další části práce bylo navrhnout a následně sestavit příslušnou SIA aparaturu, která byla tvořena pístovým čerpadlem s injekční stříkačkou, osmicestným selekčním ventilem, dvoucestným přepínacím ventilem, mísicí a reakční cívkou, spektrofluorimetrem a případně spektrofotometrem. Realizovány byly dvě odlišné koncepce průtokového uspořádání. V první variantě byla jako nosný roztok použita deionizovaná voda, do které se prostřednictvím selekčního ventilu nejprve dávkovala zóna barviva a poté analyzovaného roztoku heparinu. Ve druhé variantě bylo jako nosného roztoku použito fenothiazinového barviva, do kterého se dávkovala pouze zóna heparinu. Pro sestavenou SIA aparaturu byl v grafickém programovacím prostředí LabView 7.1. vytvořen ovládací software, umožňující řídit celý proces analýzy, snadno volit parametry stanovení a zároveň sbírat a ukládat naměřená data.

Během průtokových měření byly nejprve hledány optimální podmínky SIA stanovení heparinu v uspořádání s vodou jako nosným roztokem a spektrofluorimetrickou detekcí. Optimalizován byl vliv následujících parametrů: průměr průtokového vedení, rychlost čerpání nosného roztoku a rychlost dávkování činidel. Pro každé barvivo dále

průtoková rychlost transportu reakčních zón do detektoru, délka (objem) reakční cívky, dávkovaný poměr objemů reakčních činidel a koncentrace barviva. Z výsledků těchto měření byly navrženy optimální podmínky, za kterých byly pro jednotlivá barviva proměřeny kalibrační závislosti pro stanovení heparinu. Pro každé barvivo byla dále zjištěna opakovatelnost, mez detekce a stanovitelnosti a provedena aplikace stanovení na reálný vzorek práškového heparinu.

Dále byly pro spektrofotometrickou detekci optimalizovány podmínky průtokového uspořádání, kdy bylo nosným roztokem barvivo. Vzhledem k téměř identickému chování barviv v předchozích měřeních bylo azur A zvoleno jako modelové barvivo, pro které byla optimalizována průtoková rychlost transportu do detektoru, délka (objem) reakční cívky, dávkovaný poměr objemů reakčních činidel a koncentrace barviva. Stejně jako v předešlém uspořádání byly za nalezených optimálních podmínek získány kalibrační závislosti pro stanovení se všemi barvivy a zjištěny základní charakteristiky této varianty stanovení společně s otestováním na reálném vzorku.

Srovnáním dosažených výsledků nelze jednoznačně určit, které z testovaných barviv a který typ stanovení je pro SIA stanovení heparinu nejvýhodnější. Pro oba způsoby spektrofotometrického stanovení se jako nejvhodnější jeví použití barviva azur A, se kterým je dosaženo nejvyšší citlivosti. Zároveň ale u obou variant poskytuje menší dynamický rozsah exponenciálních kalibračních závislostí, který je nejvyšší pro azur B, případně methylenovou modř. Varianta, kdy je nosným roztokem deionizovaná voda má obecně lepší opakovatelnost a je dosaženo nižších hodnot meze detekce a ve většině případů také stanovitelnosti, které jsou nejnižší pro barvivo azur A. Rychlost analýzy je naopak větší pro stanovení využívající jako nosný roztok barvivo.

Porovnáním výsledků vypracovaných spektrofotometrických SIA stanovení heparinu s výsledky dosaženými v práci zabývající se spektrofotometrickým FIA stanovením bylo zjištěno, že spektrofotometrická detekce poskytuje horší meze detekce a stanovitelnosti, které jsou pro všechna barviva srovnatelné. Naopak lineární dynamický rozsah je pro spektrofotometrickou detekci a každé z barviv podstatně větší, než použitelný dynamický rozsah v případě detekce spektrofotometrické. Nejvyšší citlivosti stanovení je stejně jako při spektrofotometrické detekci dosaženo pro barvivo azur A.

Spektrofotometrické SIA stanovení heparinu s využitím spektrometru HR4000 s optickými vlákny připojenými k průtokové detekční „Z“ cele a externím zdrojem záření se realizovat nepodařilo. Důvodem byla nedostatečná intenzita záření dostupných zdrojů a nevyšel ani pokus o zkonstruování zdroje vlastní výroby.

## 6. LITERATURA

1. 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
2. Cerda V.: Flow Techniques in Analytical Chemistry Automation. *SciTopics*.  
<<http://www.scitopics.com>> [cit. 1. 2. 2011]
3. Skeegs L. T.: An automatic method for colorimetric analysis. *American journal of clinical pathology* **28** (1957), 311 – 322
4. Whitehead E. C.: Continuous Flow Analysis Symposium in: Advances in automated analysis. *Technicon International Congress 1976*. New York, Mediad Incorporated 1977
5. Cerda V., Estela J. M., Forteza R., Cladera A., Becerra E., Altimira P., Sitjar P.: Flow techniques in water analysis. *Talanta* **50** (1999), 695 – 705
6. Miró M., Cerfa V., Estela J. M.: Multisyringe flow injection analysis: characterization and applications. *Trends in Analytical Chemistry* **21** (2002), 199 – 210
7. Růžička J., Hansen E. H.: Flow injection analysis: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. *Analytica Chimica Acta* **78** (1975), 145 – 157
8. Stewart K. K.: Flow-injection analysis: A review of its early history. *Talanta* **28** (1981), 789 – 797
9. Estela J. M., Cerda V.: Flow analysis techniques for phosphorus: an overview. *Talanta* **66** (2005), 307 – 331
10. Růžička J., Hansen E. H.: *Flow Injection Analysis*. New York, J. Wiley 1988
11. Růžička J., Marshall G. D.: Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Analytica Chimica Acta* **237** (1990), 329 – 343
12. Paseková H., Polášek M., Solich P.: Sekvenční injekční analýza. *Chemické Listy* **93** (1999), 354 – 359
13. Růžička J.: Flow Injection Analysis, 4th Edition. Disk DVD, 2009
14. Tzanavaras P. D., Themelis D. G.: Review of recent applications of flow injection spectrophotometry to pharmaceutical analysis. *Analytica Chimica Acta* **588** (2007), 1 – 9
15. Mesquita R. B. R., Rangel A. O. S. S.: A review on sequential injection methods for water analysis. *Analytica Chimica Acta* **648** (2009), 7 – 22



16. Pérez-Olmos R., Soto J. C., Zárata N., Araújo A. N., Montenegro M. C. B. S. M.: Sequential injection analysis using electrochemical detection: A review. *Analytica Chimica Acta* **554** (2005), 1 – 16
17. Guebeli T., Christian G. D., Růžička J.: Fundamentals of sinusoidal flow sequential injection spectrophotometry. *Analytical Chemistry* **63** (1991), 2407 – 2413
18. Barnett N. W., Lenahan C. E., Simon W. L.: Sequential injection analysis. *Analyst* **127** (2002), 997 – 1020
19. Pérez-Olmos R., Soto J. C., Zárata N., Araújo A. N., Lima J. L. F. C., Saraiva M. L. M. F. S.: Application of sequential injection analysis (SIA) to food analysis. *Food Chemistry* **90** (2005), 471 – 490
20. Pimenta A. M., Montenegro M. C. B. S. M., Araújo A. N., Calatayud J. M.: Application of sequential injection analysis to pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **40** (2006), 16 – 34
21. Economou A.: Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line samplehandling and pre-treatment. *Trends in Analytical Chemistry* **24** (2005), 416 – 425
22. Růžička J.: Lab-on-valve: universal microflow analyzer based on sequential and bead injection. *Analyst* **125** (2000), 1053 – 1060
23. Wang J., Hansen E. H.: Sequential injection lab-on-valve: the third generation of flow injection analysis. *Trends in Analytical Chemistry* **22** (2003), 225 – 231
24. Miró M., Hansen E. H.: Miniaturization of environmental chemical assays in flowing systems: The lab-on-a-valve approach vis- a-vis lab-on-a-chip microfluidic devices. *Analytica Chimica Acta* **600** (2007), 46 – 57
25. Castro M. D. L., Ruiz-Jiménez J., Pérez-Serradill J. A.: Lab-on-valve: a useful tool in biochemical analysis. *Trends in Analytical Chemistry* **27** (2008), 118 – 126
26. Chen X. W., Wang J. H.: The miniaturization of bioanalytical assays and sample pretreatments by exploiting meso-fluidic lab-on-valve configurations: A review. *Analytica Chimica Acta* **602** (2007), 173 – 180
27. Český lékopis 1997, Praha, Grada 1997
28. Lincová D., Farghali H. et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*, 2. vyd., Praha, Galén 2007
29. Patil S. R., Mote U. S., Patil S. R., Kolekar G. B.: Determination of Heparin Using Norfloxacin-cerium Complex as a Fluorescence Probe by Spectrofluorimetry. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **30** (2009), 3034 – 3038

30. Bangham D. R., Mussett M. V.: The Second International Standard for Heparin. *Bulletin of the World Health Organization* **20** (1959), 1201 – 1208
31. Pharmacopedia of the People's Republic of China (second part), Beijing, People Wealth Press 1985
32. Toyoda H., Nagashima T., Hirata R., Toida T., Imanar T.: Sensitive high-performance liquid chromatographic method with fluorometric detection for the determination of heparin and heparan sulfate in biological samples: application to human urinary heparan sulfate. *Journal of Chromatography B* **704** (1997) 19 – 24
33. Zhou X.; Liu J., Zhang M., Chen S.: Determination of plasma heparin by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Talanta* **46** (1998), 757 – 760
34. Liu S, Luo H., Li N., Liu Z., Zheng W.: Resonance Rayleigh Scattering Study of the Interaction of Heparin with Some Basic Diphenyl Naphthylmethane Dyes. *Analytical Chemistry* **73** (2001), 3907 – 3914
35. Ander B., Karlsson A., Öhrlund A.: Determination of heparin on intraocular lens surfaces by ion chromatography. *Journal of Chromatography A* **917** (2001), 105 – 110
36. Gadzekpo V. P. Y., Bühlmann P., Xiao K. P., Aoki H., Umezawa Y.: Development of an ion-channel sensor for heparin detection. *Analytica Chimica Acta* **411** (2000), 163 – 173
37. Tan L., Yao S., Xie Q.: Electrochemical determination of heparin using methylene blue probe and study on competition of Ba<sup>2+</sup> with methylene blue for binding heparin. *Talanta* **71** (2007), 827 – 832
38. Ye Q., Meyerhoff M. E.: Rotating Electrode Potentiometry: Lowering the Detection Limits of Nonequilibrium Polyion-Sensitive Membrane Electrodes. *Analytical Chemistry* **73** (2001), 332 – 336
39. Zhong Z., Anslyn E. V.: A Colorimetric Sensing Ensemble for Heparin. *Journal of the American Chemical Society* **124** (2002), 9014 – 9015
40. Zhang D. H., Lu L. Y., Ge R. S., Zi Y. Q.: Spectrophotometric determination of heparin with safranin T and their interaction mechanism. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering* **1** (2007), 63 – 66
41. Li J., Liu J., Zhu X., Peng Q., Jiang Ch.: Spectrofluorimetric determination of heparin using doxycycline–europium probe. *Journal of Luminescence* **113** (2005), 305 – 313
42. Wei W., Wang H., Jiang Ch.: Spectrofluorimetric determination of trace heparin using lomefloxacin-terbium probe. *Spectrochimica Acta Part A* **63** (2006), 241 – 246

43. 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** (2009), 3034 – 3038
44. Egawa Y., Hayashida R., Seki T., Anzai J.: Fluorometric determination of heparin based on self-quenching of fluorescein-labeled protamine. *Talanta* **76** (2008), 736 – 741
45. Cheng T., Lin T., Wu T., Chang H.: Determination of heparin levels in blood with activated partial thromboplastin time by a piezoelectric quartz crystal sensor. *Analytica Chimica Acta* **432** (2001), 101 – 111
46. Mitchell S. C.: Phenothiazine: The Parent Molecule. *Current Drug Targets* **7** (2006), 1181 – 1189
47. Karpinska J., Starczewska B., Puzanowska-Tarasiewicz H.: Analytical Properties of 2- and 10- Disubstituted Phenothiazine Derivatives. *Analytical Sciences* **12** (1996), 161 – 170
48. Spencer, W., Sutter, J. R.: Kinetic study of the monomer-dimer equilibrium of methylene blue in aqueous solution. *Journal of Physical Chemistry* **83** (1979), 1573 – 1576
49. Havelcová M.: Studium vlastností a využití thiazinových barviv. Dizertační práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha 1998
50. Párkányi C., Boniface C., Aaron J. J., Maafi M.: A quantitative study of the effect of solvent on the electronic absorption and fluorescence spectra of substituted phenothiazines: evaluation of their ground and excited singlet-state dipole moments. *Spectrochimica Acta Part A* **49** (1993), 1715 – 1725
51. Laassisa B., Aaron J. J., Mahedero M. C.: Fluorimetric determination of phenothiazine derivatives by photooxidation in a flow-injection system. *Talanta* **41** (1994), 1985 – 1989
52. U. S. National Library of Medicine: ChemIDplus Advanced Application. <<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>> [cit. 19. 2. 2011]
53. Sigma-Aldrich: Online katalog. <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/>> [cit. 19. 2. 2011]
54. Wang L. K., Panzardi P. J.: Determination of Anionic Surfactants with Azure A and Quaternary Ammonium Salt. *Analytical Chemistry* **47** (1975), 1472 – 1475

55. Vandelest C. H. A., Versteeg E. M. M., Veerkamp J. H., Vankuppevelt T. H.: Quantification and Characterization of Glycosaminoglycans at the Nanogram Level by a Combined Azure A-Silver Staining in Agarose Gels. *Analytical Biochemistry* **221** (1994), 356 – 361
56. Thuy L. P., Nyhan W. L.: A new quantitative assay for glycosaminoglycans. *Clinica Chimica Acta* **212** (1992), 17 – 26
57. Gundry S. R., Klein M. D., Drongowski R. A., Kirsh M. M.: Clinical evaluation of a new rapid heparin assay using the dye azure A. *American Journal of Surgery* **148** (1984), 191 – 194
58. <<http://www.chemicaland21.com/>> [cit. 20. 2. 2011]
59. Tarayan V. M., Ovsepyan E. N., Petrosyan A. A.: Extraction of associates of uranium (VI) benzoate anion with thiazine dyes. *Zhurnal Analiticheskoi Khimii* **26** (1971), 322 – 326
60. Nayak A. N., Ramappa P. G., Yathirajan H. S., Manjappa S.: Spectrophotometric determination of microgram amounts of penicillins by solvent extraction with azure B. *Analytica Chimica Acta* **134** (1982), 411 – 415
61. Ramappa P. G., Nayak A. N.: Rapid spectrophotometric determination of saccharin in soft drinks and pharmaceuticals using Azure B as reagent. *Analyst* **108** (1983), 966 – 970
62. 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
63. Perez-Ruiz T., Martinez-Lozano C., Ochotorena J.: Analytical applications of photochemical reduction of Azur B by EDTA – iodide determination. *Talanta* **29** (1982), 479 – 484
64. Pavlík J.: *Aplikovaná statistika*, 1. vyd., VŠCHT Praha 2005
65. Eckschlager K.: *Chemometrie I*, Praha 1994
66. National instruments: LabView < <http://ni.com/labview/> > [cit. 24. 2. 2011]
-