

Sekvenční injekční analýza – laboratoř na ventilu (SIA-LOV)

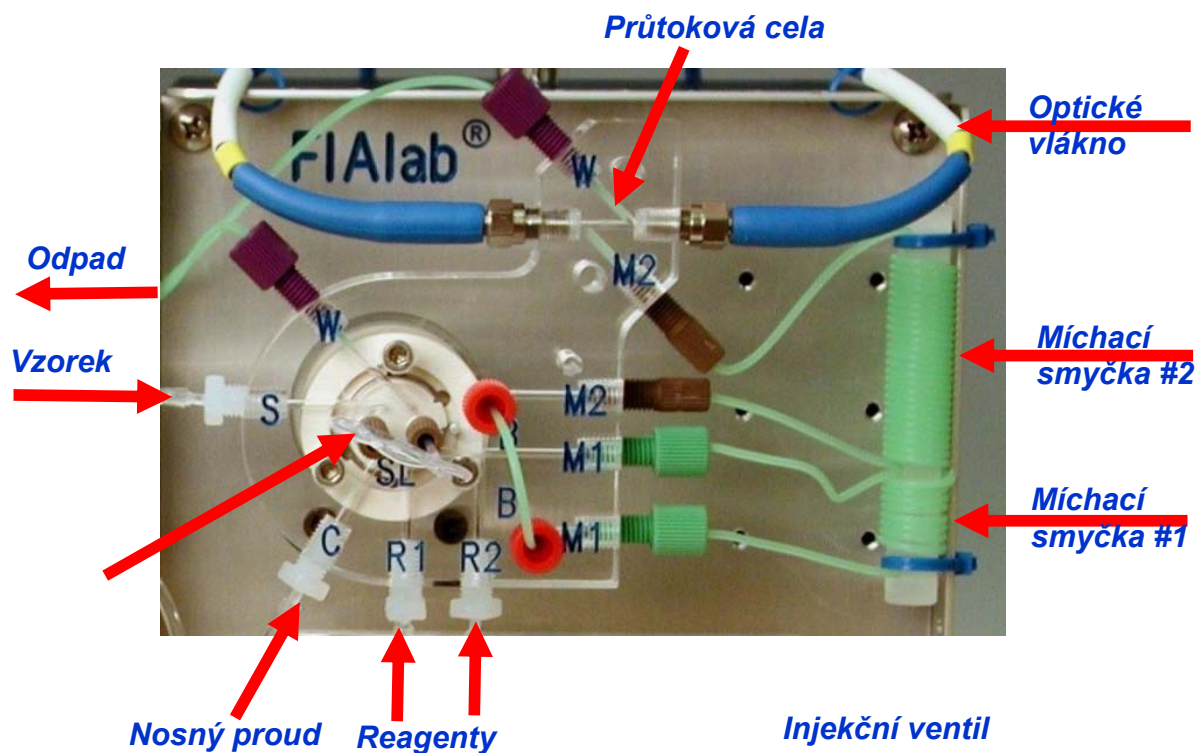
(Stanovení obsahu heparinu v injekčním roztoku)

Teorie:

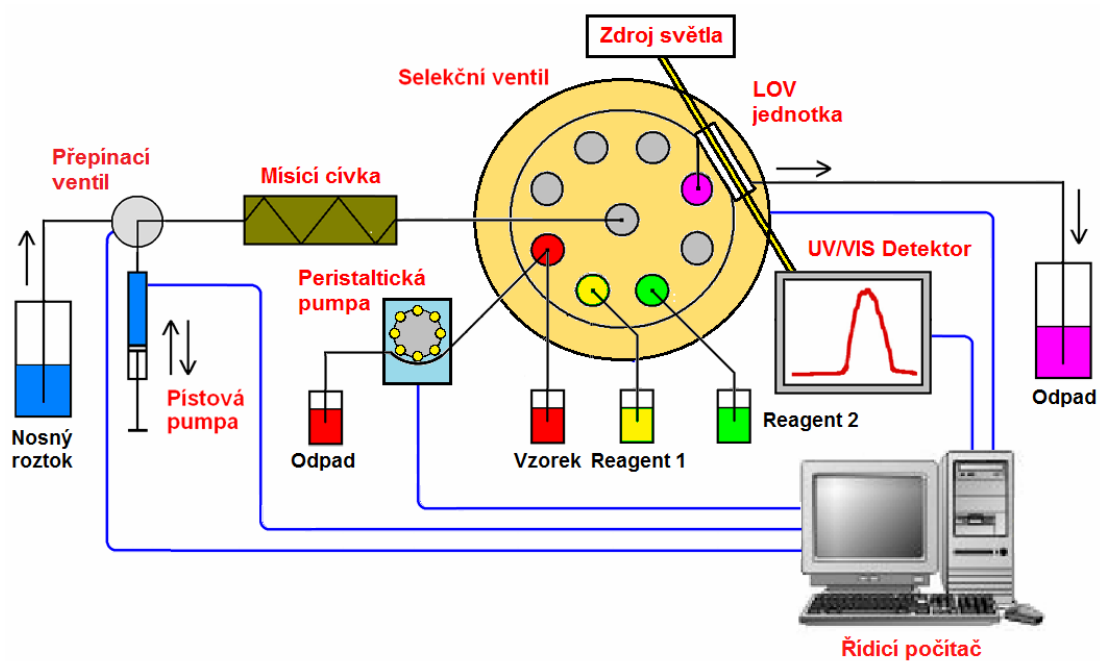
Sekvenční injekční analýza (SIA) je další technikou průtokové analýzy, která umožňuje snadnou automatizaci složitých postupů sériových analýz velkého počtu vzorků. Významnými rozdíly techniky sekvenční injekční analýzy a FIA techniky je odlišnost v geometrii nosného toku, kdy FIA využívá přímý konstantní tok, zatímco SIA využívá změnu přímého a zpětného toku. Tím je dosaženo **vyššího stupně konverze analytu** na výsledný produkt. Systém SIA pracuje v cyklu naprogramovaných pohybů čerpadla, synchronizovaných s přepínáním pozic selekčního ventilu. Získání reprodukovatelného koncentračního gradientu produktu dosáhneme přesnou synchronizací a opakovatelností jednotlivých programových kroků. Výhodou SIA techniky oproti FIA je jednokanálové uspořádání s jedním ventilem. Protože SIA využívá zastavení a změnu směru toku, jsou **spotřeby vzorku a hlavně činidel podstatně nižší než u FIA**, kde je čerpání kontinuální. Velkou výhodou je i její **flexibilita**, daná snadnou změnou parametrů měření pomocí klávesnice počítače beze změn konfigurace SIA systému.

Variantou klasické SIA techniky je technika mikrosekvenční injekční analýzy v uspořádání lab-on-valve (μ SIA-LOV). Technika μ SIA-LOV, která je považovaná za třetí generaci průtokové injekční analýzy, má za cíl dále miniaturizovat koncept SIA a začlenit do něj všechny nezbytné prvky s možnostmi využití pro nejrůznější analytické aplikace. Miniaturizace bylo dosaženo začleněním víceúčelové průtokové detekční mikrocely s optickými vlákny do kompaktní struktury umístěné na selekčním ventilu (odtud název lab-on-valve, laboratoř na ventilu) (obrázek č.1). 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. Uspořádáním optických vláken lze detekční celou konfigurovat pro měření absorbance (vlákna jsou proti sobě), fluorescence (úhel vláken 90°) nebo absorbance a fluorescence zároveň (přidáním třetího vlákna). Tzv. LOV jednotka, vyráběná z plexiskla, dále obsahuje kanálky pro manipulaci se všemi reakčními činidly a vzorky, které se do průtokového systému dávkuje přímo, sepnutím pístové nebo peristaltické pumpy.

Obr. č. 1: Lab-on-valve uspořádání



Obr. č. 2: Schématické znázornění aparatury pro techniku μ SIA-LOV



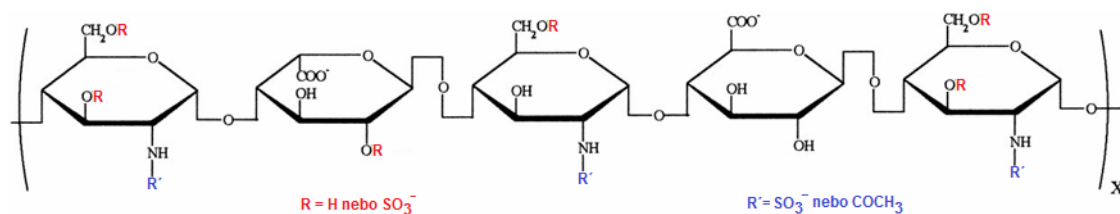
Typické uspořádání aparatury pro μ SIA-LOV je schematicky znázorněno na obrázku č. 2. Umístění detekční cely na selekční ventil má za následek značné zkrácení analytické cesty a spotřeby reakčních činidel a vzorků jsou díky práci s mikrolitrovými objemy významně nižší, než u klasické SIA. To dělá z techniky SIA-LOV ideální nástroj např. pro biochemická stanovení.

Tab. 1: Srovnání pracovních parametrů jednotlivých průtokových metod

parametr	SFA	FIA	SIA	μ SIA-LOV
objem vzorku	200 – 2000 μ l	50 – 500 μ l	50 – 200 μ l	10 – 30 μ l
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 ⁻¹	0,5 – 1,0 ml min ⁻¹ kanál ⁻¹	Řádově ml min ⁻¹	1 ml min ⁻¹
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 jednonálové	

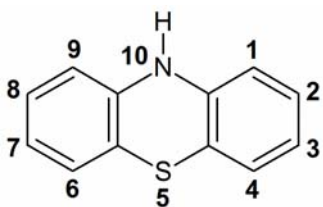
Heparin (CAS: 9041-08-1) je sodná sůl heteropolysacharidů obsahující glukosamin-N-sulfát a uronové kyseliny s proměnlivým zastoupením acetátových a sulfátových funkčních skupin (obr. č. 3). Relativní molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 12 000 – 15 000.

Obr. č. 3: Základní strukturální jednotka heparinu

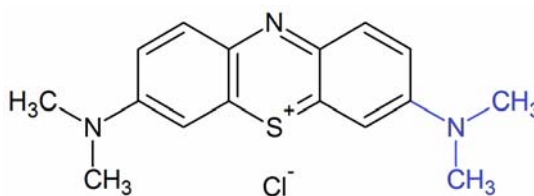


Jedná se o přirozenou látku zpomalující krevní srážlivost, kdy blokuje několik stupňů procesu srážení krve a zároveň ovlivňuje funkci krevních destiček. Heparin a jeho deriváty jsou účinné při prevenci proti trombóze a dále při léčbě akutní žilní trombózy. Jeho hladina v krvi pacienta musí být pečlivě a přesně sledována. Heparin patří do farmakologické skupiny označované jako antikoagulantia. 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 mykózy. Hodnota účinnosti mezinárodního standardu, vyhlášená Světovou zdravotnickou organizací, je 130 IU mg^{-1} .

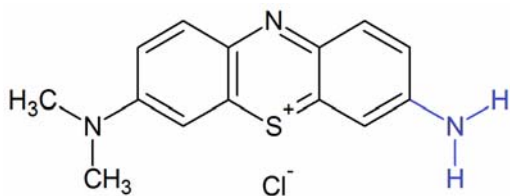
Stanovení heparinu je velmi důležitou úlohou v oblasti chemie a medicíny a proto na toto téma byla vypracována již celá řada technik. K nejvýznamnějším patří metody biologické, které jsou však mnohdy časově náročné a obtížně reprodukovatelné. Existuje však jednoduché stanovení heparinu, které je založeno na jeho reakci s fenothiazinovými deriváty (konkrétně barvivy – deriváty fenothiazinu substituovanými v polohách 3 a 7) (Obr. č. 4).



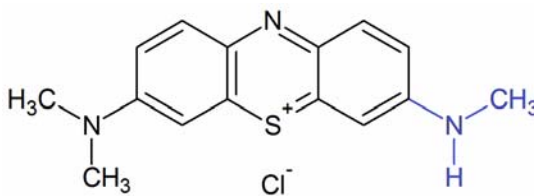
Základní skelet fenothiazinu



Methylenová modř



Azur A



Azur B

Obr. č. 4: **Fenothiazinová barviva**

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. Po ozáření UV světlem vykazují fenothiazinové deriváty fluorescenční vlastnosti. Za tyto fluorescenční vlastnosti je zodpovědný radikalkation, který vzniká v prvním reverzibilním oxidačním kroku.

Výše zmíněné stanovení je založeno právě na zhášení fluorescence příslušného radikalkationtu fenothiazinového barviva v přítomnosti heparinu.

Použitá literatura:

Růžička J.: Flow-injection analysis (Principles tutorials and resources), Multimediální prezentace 4. vydání (2009).

Bár L.: Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze 2011.

Úkol:

Stanovte obsah heparinu ve vzorku metodou sekvenční injekční analýzy – laboratoř na ventilu se spektrofluorimetrickou detekcí. Pro stanovení použijte reakci s fenothiazinovým barvivem.

Přístroje a chemikálie:

Modulární spektrometr QE65000 (OceanOptics, USA) připojený k řídicímu počítači přes USB rozhraní a ovládaný vytvořeným software pro SIA-LOV aparaturu. Křemenná optická vlákna QP600-2-SR (OceanOptics, USA) o délce 1 m pro přivedení záření ze zdroje DH2000-DUV (OceanOptics, USA) k zabudované průtokové fluorescenční cele (tloušťka absorpční vrstvy 10,00 mm) a k odvodu záření od cely ke spektrometru.

Programovatelná pístová pumpa s injekční stříkačkou o objemu 2500 μ l (ColeParmer, USA) připojená k řídicímu počítači přes sériové rozhraní RS-232C.

8-cestný selekční ventil C25-3188 (Valco International, USA) řízený digitálními výstupy řídicí karty. Na tomto ventilu je nasazena destička LOV.

Řídicí karta PCI-6036E s konektorovým blokem BNC-2110 (National Instruments, USA). Grafické programovací prostředí LabView FDS (7.1) (National Instruments, USA).

Mísící a reakční cívky o objemech 100, 150 a 300 μl , tvořené teflonovými kapilárami (vnitřní průměr 0,5 mm; délek přibližně 50, 75 a 150 cm) stočenými do spirál, teflonové spojovací kapiláry o vnitřním průměru 0,5 (VICI Valco, USA) příslušných délek.

Heparin sodný, prášek o aktivitě 110 IU mg^{-1} . Zásobní roztok o koncentraci 100 mg dm^{-3} ($11\,000 \text{ IU dm}^{-3}$) připravíme rozpuštěním 50 mg práškového heparinu v deionizované vodě a doplněním na objem 500 ml.

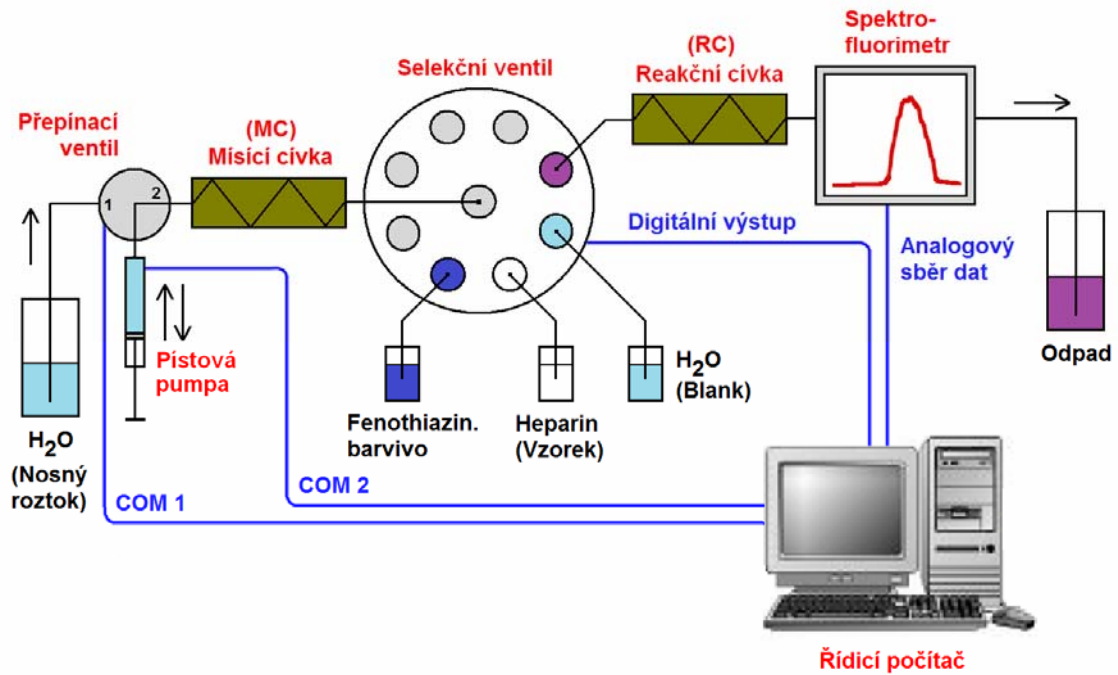
Heparin Sandoz, heparin sodný, injekční roztok o aktivitě $25\,000 \text{ IU 5 ml}^{-1}$ (Sandoz GmbH, Rakousko). Zásobní roztok o koncentraci $50\,000 \text{ IU dm}^{-3}$ připravíme použitím 1 ml injekčního roztoku heparinu, který byl deionizovanou vodou doplněn na objem 100 ml.

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 $5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ připravíme rozpuštěním 0,0146 g azuru A v deionizované vodě a doplněním na objem 100 ml.

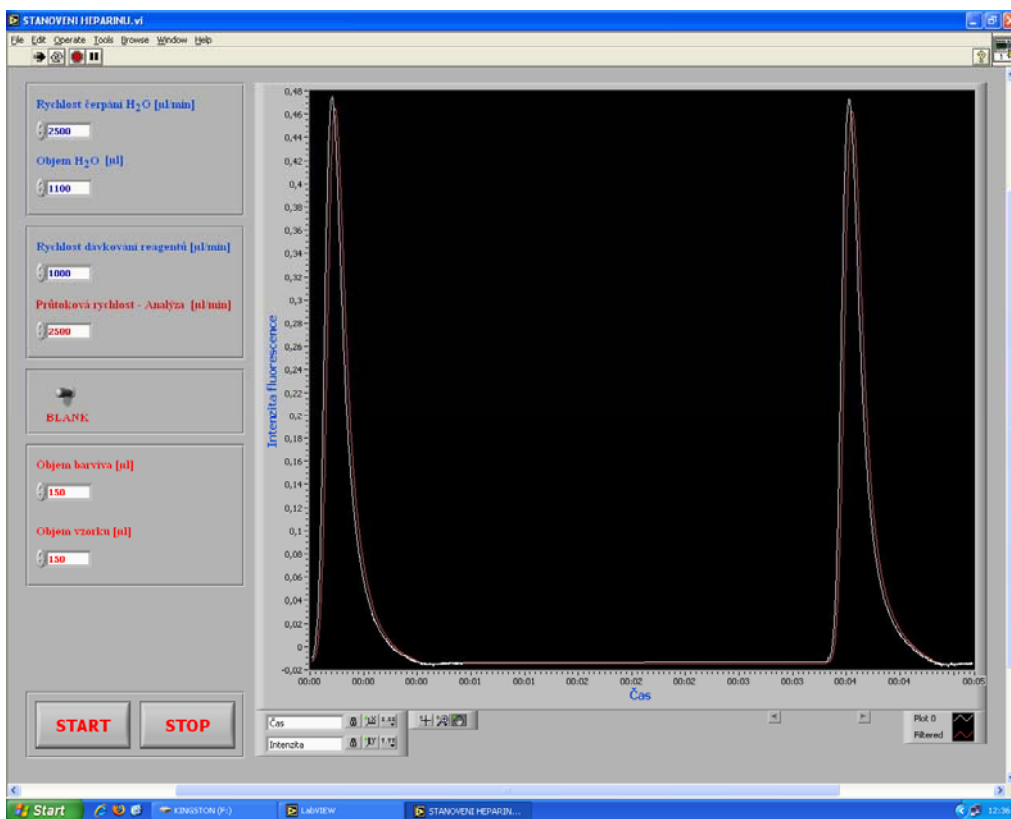
Pracovní postup a ovládání aparatury:

1. Ze zásobního roztoku heparinu o aktivitě $11\,000 \text{ IU dm}^{-3}$ připravíme sadu kalibračních roztoků v koncentračním rozmezí $0 - 10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.
2. Sestavíme aparaturu pro měření podle obrázku (Obr. č. 5) (pedagogický dozor praktika vám s propojením všech součástí aparatury a počítače poradí).
3. Zapneme spektrometr připojením USB kabelu k řídicímu počítači.
4. Zapneme pístové čerpadlo; příslušné hadičky zasuneme do odpovídajících odměrek a do odpadní nádoby.
5. Na řídicím počítači spustíme program „LabView“ a po jeho inicializaci otevřeme vlastní vytvořený řídicí software „SIA-LOV praktika“ v adresáři „Praktika“.

Obr. č. 5: Schéma aparatury pro SIA-LOV stanovení heparinu



Obr. č. 6: Kontrolní panel ovládacího software pro SIA-LOV



6. Na čelním panelu (obr. č. 6) tohoto virtuálního přístroje musíme navolit následující parametry analýzy:

dávkovaný objem vzorku	150 μl
dávkovaný objem barviva	150 μl
průtoková rychlost dávkování	1,0 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
průtoková rychlost analýzy	2,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
rychlost čerpání vody	2,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$

7. Tím je aparatura připravena pro měření. Nejdříve proměříme jednotlivé body kalibrační závislosti včetně nulové hodnoty a potom neznámý injekční vzorek. Všechna měření opakujeme 4 krát (nulovou hodnotu 10 krát).

Měření provádíme takto: Vstupní hadičku pro nasávání daného roztoku zasuneme do příslušného roztoku a na ovládacím panelu virtuálního přístroje pro SIA analýzu spustíme měření tlačítkem „Start“. Ovládací program nejdříve inicializuje ovládání spektrofotometru, nastaví jeho parametry měření; v průběhu analýzy pak před vlastním průchodem reakční směsi detektorem tento detektor vynuluje a ve vhodný časový okamžik spustí sběr dat v čase.

Software dále inicializuje ovládání pístového čerpadla a selekčního ventilu a v průběhu analýzy nastavuje průtokové rychlosti i objemy čerpaných složek a ve vhodné okamžiky spouští čerpání.

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 (obr. č. 5) 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, 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 μ l. Pístová pumpa je naprogramována tak, aby píst injekční stříkačky zastavila ve stejné poloze, v jaké byl na samém začátku analýzy (výchozí poloha).

Vyhodnocení výsledků:

1. Ze všech digitalizovaných časových závislostí intenzity fluorescence kalibračních roztoků odečteme výšky SIA píků; statisticky je zhodnotíme; sestrojíme kalibrační závislost; zjistíme citlivost stanovení, mez detekce a mez stanovitelnosti. Nakonec odečteme skutečnou aktivitu heparinu v roztoku připraveném z injekční formy.
2. Z časových průběhů SIA píků odhadneme maximální frekvenci analýz za daných optimálních podmínek analýzy.

Poděkování:

Děkujeme agentuře FRVŠ (projekt 371/2011) za poskytnutí finančních prostředků na zakoupení potřebné instrumentace pro provedení této úlohy (modulárního spektrometru QE65000 s vláknovou optikou firmy OceanOptics se zdrojem záření DH2000-DUV a optickými vlákny QP600-2-SR).