

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Fakulta přírodovědecká
Katedra analytické chemie**



**Vývoj miniaturizovaných nízkonákladových
testů pro klinickou a forenzní analýzu**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Fakulta přírodovědecká
Katedra analytické chemie**



**Vývoj miniaturizovaných nízkonákladových
testů pro klinickou a forenzní analýzu**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Bc. Lenka Hárendarčíková

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.

Olomouc 2014

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Vlastnoruční podpis

Děkuji svému vedoucímu diplomové práce doc. RNDr. Janu Petrovi, Ph.D. za konzultace, cenné rady a připomínky, které mi během měření a psaní diplomové práce poskytl.

Dále bych chtěla poděkovat Ing. Bc. Tomáši Krajíčkovi za motivaci a své rodině a přátelům za jejich podporu po celou dobu mého studia.

SOUHRN

Cílem této diplomové práce je vývoj nízkonákladového testovacího zařízení pro analýzu léčiv. Toto zařízení by mělo být schopno nahradit moderní instrumentální metody. Mělo by výrazně zjednodušit prováděné analýzy a zároveň snížit náklady na jejich provedení.

V teoretické části této práce nejprve popisují klinickou a forenzní chemii, charakter vzorků a seznamují s instrumentálními metodami, které jsou dnes využívány v klinických a forenzních laboratořích. Poté charakterizují proces miniaturizace a zmiňují některé současné objevy v této problematice. Poslední pasáže teoretické části věnují strukturalizaci a popisu léčiv, které jsou následně v praktické části analyzovány.

Praktická část nejprve popisuje vyvinuté mikrofluidní zařízení, včetně jeho úvodního testování a procesu optimalizace následného stanovení. A poslední část demonstruje získané výsledky při aplikacích na konkrétních léčivech.

SUMMARY

The aim of this master thesis is a development of low-cost test device for drugs analysis. This device should be able to replace modern instrumental methods. It should be able to greatly simplify the analysis and reduce the cost of their implementation.

In the theoretical part of this thesis I describe the clinical and forensic chemistry, sample characters and acquaint with instrumental methods, which are commonly used in clinical and forensic labs. Then I describe the miniaturization process and mention some recent discoveries in this field. Last passages of theoretical part I devote to structuring and description of drugs, which are analysed in practical part of this thesis.

At first, the practical part describes a developed microfluidic device, including the initial testing and optimization process of subsequent determination. And the last part demonstrates the results obtained in applications on specific drugs.

BIBLIOGRAFICKÉ ÚDAJE

Jméno a příjmení autora:	Bc. Lenka Hárendarčíková
Název práce:	Vývoj miniaturizovaných nízkonákladových testů pro klinickou a forenzní analýzu
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Katedra analytické chemie, Univerzita Palackého, Olomouc
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.
Rok obhajoby:	2014
Abstrakt:	Tato práce řeší vývoj a využití nízkonákladového mikrofluidního zařízení v klinické a forenzní analýze. Čip vyrobený z laminovací fólie a papíru je použit k analýze léčiv. K detekci analytů je využita UV lampa.
Klíčová slova:	mikrofluidní zařízení, léčiva, klinická analýza, forenzní analýza
Počet stran:	58
Počet příloh:	0
Jazyk	český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname:	Bc. Lenka Hárendarčíková
Title:	Development of miniaturized low-cost tests for clinical and forensic analysis
Type of thesis:	Master
Department:	Department of Analytical Chemistry, Palacký University Olomouc
Supervisor:	doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.
The year of presentation:	2014
Abstract:	This thesis describes development and utilization of microfluidic device in clinical and forensic analysis. Chip base on laminating foil and paper is used for drugs analysis. UV lamp is used as detector of analytes.
Keywords:	microfluidic device, drugs, clinical analysis, forensic analysis
Number of pages:	58
Number of appendices:	0
Language:	czech

OBSAH

1.	Úvod	1
2.	Teoretická část.....	2
2.1	Forenzní věda	2
2.1.1	Forenzní (kriminalistická) chemie	2
2.2	Klinická chemie.....	3
2.3	Charakter vzorků	3
2.3.1	Vzorky v klinické analýze a jejich úprava.....	3
2.3.2	Vzorky ve forenzní analýze	3
2.4	Instrumentální metody.....	4
2.4.1	Instrumentální metody využívané ve forenzní toxikologii.....	4
2.4.1.1	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí a kvadrupólovým analyzáto- rem (GC-QMS)	4
2.4.1.2	Plynová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (GC-MS-MS).....	5
2.4.1.3	Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS).....	5
2.4.1.4	Cyklická voltametrie	6
2.4.1.5	Kapilární elektroforéza (CE).....	6
2.4.2	Instrumentální metody v klinické chemii	7
2.4.2.1	Enzymová analytika	7
2.4.2.2	Vibrační spektrometrie	8
	Infračervená spektrometrie:	8
	Ramanova spektrometrie	9
2.4.2.3	Speciační analýza.....	9
	Kapalinová chromatografie.....	10
	Prvkově specifické detektory	11
2.4.2.4	Imunochemické metody	11
	Serologické metody	12
	Precipitační metody.....	12
	Imunonefelometrie a imunoturbidimetrie	12

Aglutinační metody	12
Precipitační metody využívající vazbu komplementu	13
Imunodifuzní metody.....	13
Imunoelektroforéza	13
Imunoblotting.....	14
Imunofixace.....	14
Imunodifuze	14
Elektroimunodifuze	15
ELISA	15
2.5 Miniaturizace metod.....	17
2.5.1 Využití miniaturizovaných zařízení v praxi	17
2.6 Léčiva	22
2.6.1 Analgetika.....	22
2.6.2 Anestetika	24
2.6.3 Hypnotika a sedativa	24
2.6.4 Chemoterapeutika.....	25
2.6.5 Psychofarmaka	26
2.6.6 Antihistaminika	26
3. Cíl Práce	28
4. Praktická část.....	29
4.1 Přístroje a pomůcky.....	29
4.2 Chemikálie.....	29
4.3 Příprava vzorků a jejich uchovávání	29
5. Výsledky a diskuze.....	31
5.1 Zkouška odolnosti filtračního papíru	31
5.2 Zkoušky toku reagensů filtračním papírem	32
5.3 Popis mikrofluidního zařízení a volba dávkování vzorku.....	34
5.4 Volba mobilních fází.....	39
5.5 Detekce analytů	40
5.6 Analýza léčiv v univerzální mobilní fázi	41

5.7	Jiné mobilní fáze	41
5.8	Vyhodnocení	42
6.	Závěr.....	43
7.	Seznam použité literatury	44
8.	Seznam zkratek.....	47

1. ÚVOD

Vzhledem k tomu, že v posledních dvaceti až pětadvaceti letech je kladen velký důraz na výzkum a vývoj miniaturizovaných zařízení pro analytické a bioanalytické analýzy (lab-on-chip), rozhodla jsem se pro výzkum zaměřený na vývoj mikrofluidního zařízení pro klinickou a forenzní diagnostiku. V současnosti mají v této oblasti stále nezastupitelnou úlohu analytické instrumentální metody. S jejich pomocí se klinická chemie snaží porozumět nemocem a lidskému zdraví. Forenzní chemie pak tyto metody využívá ke zkoumání kriminalistických stop. Avšak i v těchto specifických laboratořích už mikrofluidní zařízení nachází svá uplatnění. Například J. Vacek z Akademie Věd České Republiky zkoumá využití proteinových čipů v klinické biochemii. V zahraničí jsou počátky výzkumu a vývoje miniaturizovaných papírových zařízení pro klinické testy spojeny se jménem profesora Whitesidese z Harvardské Univerzity.¹

V této práci se zaměřuji na vývoj a následnou aplikaci papírového čipu (mikrofluidního zařízení) pro analýzu léčiv, který by měl být schopen plně nahradit běžně využívané instrumentální metody, výrazně snížit pořizovací a provozní náklady na zařízení, zjednodušit dané analýzy a zkrátit jejich dobu. V neposlední řadě by měl disponovat co nejnižšími výrobními náklady, snadnou manipulovatelností a obsluhou.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 FORENZNÍ VĚDA

Forenzní věda (neboli forenzika) se zabývá vyšetřováním, získáváním a dokazováním nějakého incidentu nebo porušení práva či zákonů.²

Mezi forenzní vědy řadíme:

- daktyloskopii (zabývající se určováním identity osob pomocí otisků prstů),
- forenzní antropologii (identifikující kostry, lebky a chrupy),
- balistiku (zabývající se analýzou zbraní),
- forenzní medicínu (stanovující příčiny poškození zdraví nebo smrti),
- forenzní psychologii (posuzující psychický stav a motiv podezřelého),
- forenzní genetiku (analyzující DNA osob či stop zajištěných na místě činu),
- forenzní chemii.³

2.1.1 Forenzní (kriminalistická) chemie

Forenzní chemie se zabývá zkoumáním chemické a fyzikální struktury kriminalistických stop, analyzuje jejich složení a kvantitativní obsah jednotlivých složek. Určuje a charakterizuje technologii použití určitých prostředků, průběh vzniku různých stop, způsob narušení předmětu, čas, dobu a průběh děje. Charakterizuje prostředí související s určitou událostí. Zjišťuje přítomnost toxických látek v biologických tkáních a tělesných tekutinách, v půdě, vodě a v ovzduší.⁴

2.2 KLINICKÁ CHEMIE

Klinická chemie je multidisciplinární obor, jehož náplní je stanovování jednotlivých metabolitů, analytů nebo jejich skupin obsažených v tělních tekutinách a monitorování hladiny některých léků. Je aplikací chemických, molekulárních a buněčných principů a technologií. Účelem je porozumět lidskému zdraví a nemoci a umožnit jeho hodnocení, díky poskytovaným výsledkům měření a pozorování se vztahem k nemoci a udržení zdraví.⁵

2.3 CHARAKTER VZORKŮ

2.3.1 Vzorky v klinické analýze a jejich úprava

V klinické analýze jsou nejčastějšími vzorky krev (případně krevní sérum, plazma) a moč. Tkáň a ostatní tělní tekutiny nejsou tak časté, nicméně pro klinické stanovení jsou tyto vzorky neméně důležité. Vzorkům musíme věnovat péči a pozornost nejen při předúpravě k analýze, ale již během odběru a skladování. Krev bývá nejčastěji vzorkována pomocí injekční jehly a je sbírána do vialek nebo kontejnerů vyrobených z inertního materiálu. Sběrné nádoby většinou obsahují antikoagulační činidla a konzervanty, které zabraňují nežádoucím změnám vzorku během skladování. Pokud biologické vzorky neskladujeme při specifických podmínkách, pro ně charakteristických, může dojít k vymizení analytu ze vzorku. Analyty tohoto charakteru jsou velice labilní. Většinou se vzorky skladují za snížené teploty, a pokud to jejich charakter dovolí, je možná i lyofilizace (vakuové vymrazování). Většina biochemických stanovení je prováděna v automatických zařízeních, které vyžadují kapalné vzorky. Proto k nejčastějším krokům předúpravy vzorku patří rozpouštění a vysrážení proteinů, případně extrakce.⁶

2.3.2 Vzorky ve forenzní analýze

Vzorky pro forenzní stanovení jsou sbírány na místě činu nebo z oběti a slouží jako důkazní materiál v kriminálním vyšetřování nebo u soudu. Jejich hlavním cílem je spojení pachatele se zločinem. Vzorky mohou být různorodého charakteru. Např. při stanovení toxických kovů jsou nejčastějšími vzorky vlasy, nehty, moč, krev, krevní plazma nebo sérum a sliny. Dále dle charakteru místa činu a samotného zločinu: polymery, vlákna, barviva,

nátěry, dokumenty, střelné zbraně a vzorky obsahující povýstřelové zplodiny, vzorky z požárů a ohořelých míst, léčiva, toxikologické vzorky a spousta dalších.^{6, 7}

V případě, že se nám do rukou dostane neznámý vzorek, je dobré nejprve provést screeningové testy, elementární analýzu a důkazové reakce pro bližší specifikaci neznámého vzorku. Podle zjištěných informací poté volíme metody předúpravy vzorku, prekoncentrační techniky a konečné metody stanovení.

2.4 INSTRUMENTÁLNÍ METODY

2.4.1 Instrumentální metody využívané ve forenzní toxikologii

2.4.1.1 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí a kvadrupólovým analyzátozem (GC-QMS)

Plynová chromatografie odděluje sloučeniny na bázi rozdílné těkavosti v kapalné, plynné a pevné fázi. Je to metoda založená na rozdělování složek analytu mezi mobilní (nosný plyn) a stacionární fázi (umístěna na koloně).^{8, 9}

GC-QMS vyžaduje, aby byly analyty chemicky vyextrahovány ze vzorků (krev, moč a další matrice) a derivatizovány tak, aby byly těkavé před zavedením do přístroje. Po separaci jsou molekuly ionizovány. Nejčastěji se ve spojení s plynovým chromatografem využívá ionizace elektronem. Po průchodu chromatografickou kapilární kolonou je vzorek veden do iontového zdroje kvadrupólového hmotnostního spektrometru, kde je bombardován svazkem elektronů. Vznikají tak nestabilní kladně nabitě molekulární ionty, které se dále fragmentují a jsou detekovány v hmotnostním analyzátoru. Obsah a přítomnost jednotlivých analytů je poté určována poměrem hmotnosti a náboje (m/z) a hojností vzniklých fragmentů.⁹

Kvadrupólový analyzátor je sestaven ze čtyř kovových tyčí, na dvě protilehlé je vloženo střídavé a stejnosměrné napětí. Ionty přiváděné do prostoru mezi tyče začnou oscilovat. Napětí na tyčích je voleno tak, aby prošly vždy pouze ionty s určitým poměrem m/z .⁵

2.4.1.2 Plynová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (GC-MS-MS)

V tandemové technice je principem fragmentace kolizí indukovaná disociace (CID). Ionizovaný vzorek je urychlován elektrickým nábojem. Díky srážkám s neutrálními molekulami kolizního plynu dochází k fragmentaci. Uspořádání je takové, že mezi dva hmotnostní analyzátory je vložena tzv. kolizní cela.⁹

2.4.1.3 Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS)

V kapalinové chromatografii opět dochází k dělení složek mezi stacionární a mobilní fází. V tomto případě je vzorek rozpuštěn v mobilní fázi (rozpouštědlo nebo směs rozpouštědel). Mobilní fáze poté prochází kolonou, která je naplněná vhodnou stacionární fází (sorbentem). Sloučeniny jsou rozděleny na základě různého rozdělování v obou fázích. Kapalinová chromatografie je z hlediska úpravy vzorku výhodnější, jelikož není nutné vzorek upravovat (např. derivatizací). A je možné identifikovat a kvantifikovat tepelně labilní a polární sloučeniny.⁹

V tomto uspořádání se využívá ionizace elektrosprejem, kdy je rozpuštěný analyt přiveden na kovovou kapiláru, na kterou je vloženo vysoké napětí. Pomocí zmlžujícího plynu dochází ve vzniku kapiček, na jejich povrchu je velké množství nábojů. Vlivem odpařování rozpouštědla dojde ke zvýšení hustoty náboje a následné Coulombické explozi. Což je rozpad na menší kapičky s rozdělením původního náboje. Opakování tohoto procesu vede ke vzniku iontů.¹¹

Ve spojení s kapalinovou chromatografií se ve forenzní toxikologii užívá iontová past, kvadrupólový analyzátor, ale také tandemové uspořádání s kolizní celou. Iontová past je analyzátor složený ze tří elektrod. Střední prstencové a dvou, které tvoří dno a záklop iontové pasti. Tím, že se zvyšuje frekvence prstencové elektrody se dráhy iontů o určitém poměru m/z stanou nestabilní. Tyto ionty pak vylutují z iontové pasti.¹⁰

2.4.1.4 Cyklická voltametrie

Elektrochemická detekce bývá užívána ve spojení s kapalinovou chromatografií. Identifikuje sloučeniny v roztoku měřením elektrického proudu jako funkci rozdílu potenciálů mezi dvěma elektrodami, které jsou v kontaktu s roztokem analytu. Při cyklické voltametii nejprve zvyšujeme potenciálový rozdíl mezi elektrodami a sloučenina se redukuje na povrchu katody. Při tomto ději pozorujeme nárůst proudu. Ke zvyšování napětí dochází, až do určitého limitu, kdy dojde k obrácení polarity. Katoda se stává anodou a opět se zvyšuje potenciálový rozdíl. Sloučenina se oxiduje, až do doby kdy dosáhne oxidačního potenciálu (odpovídá hodnotě redukčního potenciálu). Analyt je poté identifikován podle hodnoty napětí potřebného pro jeho oxidaci a redukci. Koncentrace analytu je přímo úměrná množství zaznamenaného proudu. Její hodnotu získáme porovnáním se standardy.⁹

2.4.1.5 Kapilární elektroforéza (CE)

Elektroforéza je definovaná jako metoda oddělující analyty na základě rozdílného pohybu nabitých částic (iontů) v elektrickém poli. Hlavní veličinou je elektroforetická pohyblivost, což je rychlost pohybu nabitých částic v kapalném prostředí ve stejnosměrném elektrickém poli o jednotkové intenzitě. Neméně důležitý je i elektroosmotický tok, který vzniká působením stejnosměrného elektrického pole na difuzní část elektrické dvojvrstvy na rozhraní pevné a kapalné fáze u vnitřní stěny kapiláry. Elektroosmotický tok unáší přítomné ionty stejnou rychlostí, ale významně ovlivňuje výslednou migrační rychlost analytů, čímž je ovlivněna účinnost separace i čas analýzy. V kapilární elektroforéze se používají křemenné kapiláry s průměrem 25-150 μm , které jsou obvykle plněny pufrům. Jednou z největších výhod kapilární elektroforézy je různorodost jejího využití. Původně byla navržena pro analýzu biologických makromolekul. Ale v současné době se používá k separaci aminokyselin, chirálních léčiv, vitamínů, pesticidů, barviv, peptidů a bílkovin, sacharidů, DNA a mnoha dalších sloučenin. Dalšími výhodami této metody jsou požadavky na malý objem pufru i vzorku. A možnost analýzy bazických, neutrálních i kyselých sloučenin během jedné analýzy.^{9, 12, 13}

2.4.2 Instrumentální metody v klinické chemii

Dříve zmiňované metody používané ve forenzní toxikologii, jsou taktéž využívány při klinických stanoveních. Dále tedy budu pojednávat jen o metodách výše nezmíněných.

2.4.2.1 Enzymová analytika

V klinické chemii a biochemii má enzymová analytika dvojí zastoupení. Jednak enzymy patří mezi nejsledovanější analyty, mající obrovský diagnostický význam. A na druhé straně jsou i často používanými analytickými činidly vzhledem k jejich specifitě, rychlosti analýzy a šetrným podmínkám. Taktéž se samozřejmě využívá v aplikacích forenzní analýzy.⁵

Pokud stanovujeme enzym jako analyt, jsou hlavními parametry ovlivňujícími jejich stanovení teplota, druh a koncentrace pufru, druh a koncentrace substrátu a v neposlední řadě i modifikátory enzymových reakcí (akcelerátory a moderátory). Mezi *moderátory* enzymových reakcí patří aktivátory a inhibitory, což jsou látky zvyšující a tlumící aktivitu enzymů. *Substrátem* v enzymových reakcích jsou obecně všechny fyziologicky měnitelné látky. Pro stanovení katalytické koncentrace enzymu se používají syntetické substráty, u kterých reakce probíhají rychleji. Přírodní substráty se pro tyto stanovení příliš nehodí. Výběr substrátu bývá omezen jeho rozpustností. *Pufry* se v enzymové analýze užívají proto, že většina enzymů vykazuje maximální aktivitu při určitém, velmi úzkém, rozsahu pH. Optimální tepelná stabilita většiny enzymů leží mezi *teplotou* 20-50°C. Se zvyšující se teplotou denaturace roste stabilita enzymů při nižších teplotách, nicméně odolnost vůči denaturaci lze zvýšit kotvením na nosič nebo genetickým či biotechnologickým zásahem.⁵

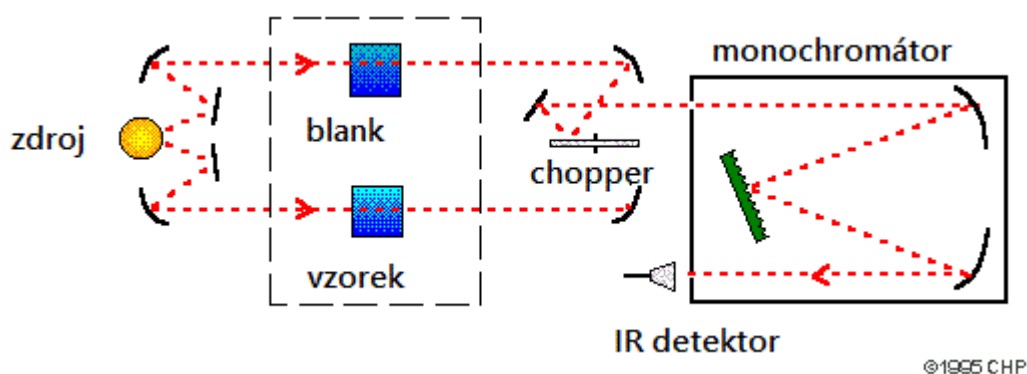
Pomocí enzymových reakcí můžeme stanovovat koncentraci substrátu (z rychlosti enzymové reakce). Dále můžeme stanovit každou látku zúčastněnou enzymové reakce (např. metabolity). Po ukončení enzymové reakce se vhodným fyzikálním či chemickým postupem může stanovit nezreagovaný nebo naopak zreagovaný podíl dané látky.⁵

2.4.2.2 Vibrační spektrometrie

Jedná se o jednu z nejjednodušších cest, jak získat informace o chemickém složení látky, molekulové struktury a molekulárních interakcích v buňkách nebo tkáních. Každá změna molekulové struktury je zároveň provázená změnou vibračního spektra, což lze v klinické chemii využít k diagnostice. Vibrační spektrometrie se používá k analýze tělních tekutin (kvantifikace glukosy a močoviny v plné krvi), k analýze zmražených či čerstvých tkání (diagnostika rakovinných tkání), k neinvazivním stanovením, identifikaci a charakterizaci klinicky důležitých mikroorganismů. Vibrační spektrum získáváme buď pomocí infračervené, nebo Ramanovy spektrometrie.¹⁴

Infračervená spektrometrie:

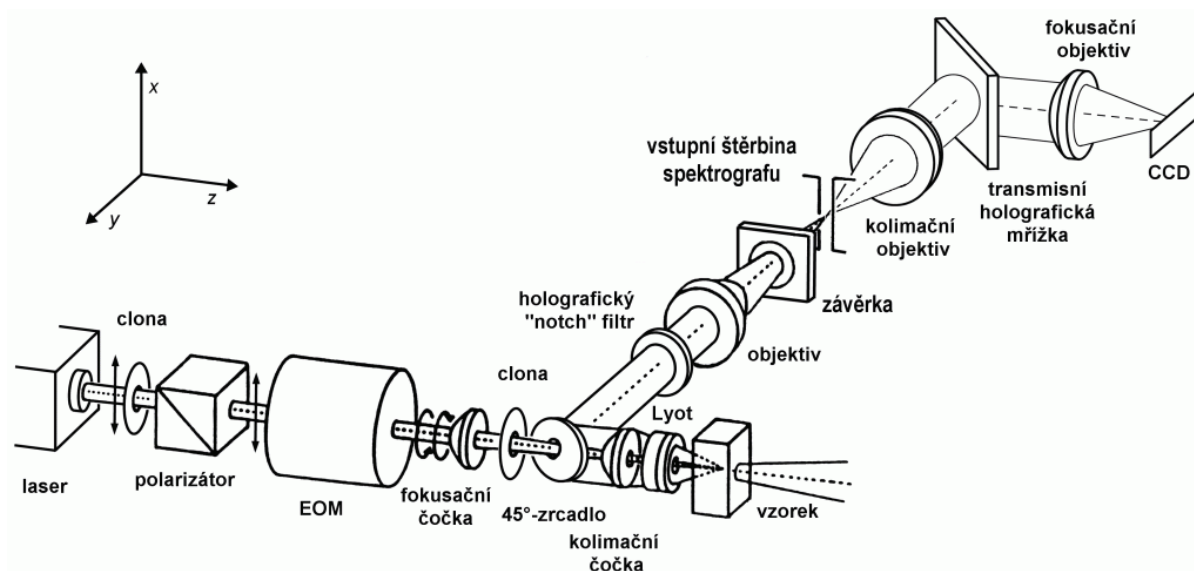
Princip infračervené spektrometrie spočívá v ozařování vzorku svazkem infračerveného záření. Při absorpci tohoto záření vzorkem dochází ke zvýšení vibračních a rotačních stavů molekul. A následně se zkoumá, k jakému zeslabení záření došlo při průchodu měřeným vzorkem pro jednotlivé vlnové délky. Infračervenou oblast záření rozdělujeme na blízkou, střední a dalekou, přičemž pro interpretaci je nejčastěji volena oblast střední. Ve které je spektrum děleno na tzv. oblast charakteristických skupinových vibrací (sloužící pro identifikaci funkčních skupin v molekule) a oblast otisku palce (umožňující identifikovat konkrétní organickou látku). Princip infračerveného spektrometru je popsán na obrázku 1.^(10, 14)



Obr. 1.: Schéma infračerveného spektrometru¹⁵

Ramanova spektrometrie

Ramanova spektrometrie je další nedestruktivní analytickou metodou, která je založená na rozptylu záření. Ramanovo spektrum je závislostí intenzity rozptýleného záření na jeho vlnové délce. Při průchodu záření vzorkem fotony interagují s vibrujícími molekulami, což vede k pružné srážce (Rayleighův rozptyl), či nepružné srážce (Ramanův rozptyl). Při pružných srážkách foton zachovává svou energii, naopak při nepružných srážkách dochází ke změně jeho frekvence o diferenci odpovídající rozdílu vibračních hladin v molekule. Schéma popisující jednotlivé části Ramanova spektrometru je na obrázku 2.^(10, 14)



Obr. 2: Ramanův spektrometr¹⁶

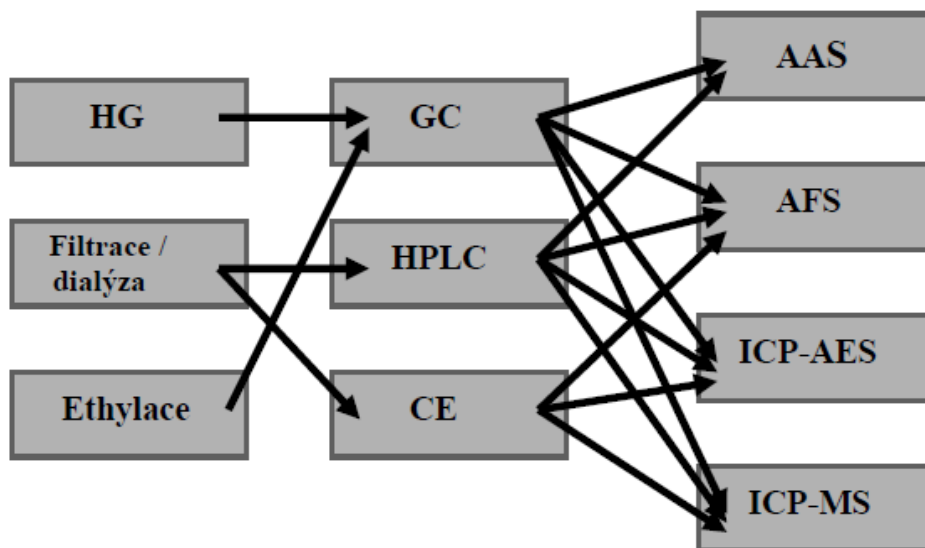
2.4.2.3 Speciační analýza

Jedná se o analytickou činnost vedoucí ke stanovení zastoupení jednotlivých specií prvku ve vzorku. Identifikují a stanovují se při ní jednotlivé formy stopových prvků. Jejichž vliv na živé organismy závisí na chemické formě, ve které prvek do organismu vstupuje, a možných transformací těchto forem v organismu. Díky této identifikaci poté lépe porozumíme chemickým a biochemickým procesům v živých organismech, budeme mít ucelenější pojem o toxicitě nebo esencialitě jednotlivých sloučenin stopových prvků. Zároveň pochopíme jejich význam pro lidský organismus, vstřebávání, pohyb v organismu,

uchovávání, vylučování a toxicitu. Hlavním cílem těchto analýz v klinických vzorcích je objasnit vztahy jednotlivých vazebných forem prvku k fyziologickým a metabolickým procesům spojených se zdravím a nemocemi. Nejčastěji se ke speciální analýze používají tandemové techniky (viz. obrázek 3). Vznikají spojením účinné separační techniky s vysoce citlivým prvkově selektivním detektorem.¹⁴

Kapalinová chromatografie

Pro účely speciální analýzy se využívá iontově výměnná chromatografie (IEC), gelová permeační chromatografie (SEC) a chromatografie s reverzními fázemi (RP-HPLC). *Iontově výměnná chromatografie* je založená na interakcích mezi kationty a anionty v mobilní fázi a stacionární fázi, která má buď pozitivně nebo negativně nabitě funkční skupiny (katex nebo anex). *Gelová permeační chromatografie* funguje obdobně jako molekulová síta. Dělení specií probíhá podle jejich velikosti či tvaru jejich molekul. Dle odlišné molární hmotnosti se liší i časy, po které je molekula zadržována v pórech gelu. U *chromatografie s reverzními (obrácenými) fázemi* je analyt dávkován do polární mobilní fáze (např. voda-methanol, voda-acetonitril) a separován na nepolární stacionární fázi (např. silikagel s chemicky vázaným uhlíkatým řetězcem, nejčastěji C18).¹⁴



Obr. 3: Tandemové techniky využívané ve speciální analýze¹⁴

Prvkově specifické detektory

Obecnými požadavky na tento druh detektoru jsou dostatečná citlivost pro detekci daného prvku, práce v kontinuálním režimu a možnost propojení se separační technikou (nejčastěji přes interface). Příklady těchto detektorů jsou: *Atomová absorpční spektrometrie (AAS)*, což je kvantitativní analytická metoda, využívaná ke stanovení kovů a metaloidů. Principem je převedení vzorku na páry atomů a měření absorpce, která je charakteristická pro daný prvek. *Atomová fluorescenční spektrometrie (AFS)* měří emisi záření plynnými atomy. Emise vzniká při přechodu elektronů do nižšího energetického stavu, které byly excitovány absorpcí elektromagnetického záření z primárního zdroje. *Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS)* je analytickou metodou, která nejprve převádí molekuly vzorku na ionty, a poté je stanovuje podle odlišného poměru hmotnosti a náboje. Výstupem je hmotnostní spektrum. Jedná se o závislost četnosti vzniklých iontů na hodnotách poměru m/z . Největší výhodou těchto detektorů jsou multielementární měření, nízké detekční limity pro stanovení většiny prvků a možnost zjištění izotopového zastoupení.^{10, 14, 17}

2.4.2.4 Imunochemické metody

Imunochemie zkoumá chemii antigenů a protilátek, včetně mechanismů jejich interakcí s dalšími molekulami účastnícími se imunitních reakcí. Imunitní systém slouží k ochraně organismu, rozpoznává cizorodé látky a odstraňuje je. Jeho reakce (tzv. imunitní odpověď) může být pro organismus prospěšná (vznik imunity) nebo škodlivá (imunopatologické reakce). Jeho dvěma hlavními funkcemi jsou imunologický dohled (zjištění poškozené nebo odcizené vlastní buňky, její označení a odstranění) a obrana před parazity (mikroorganismy, bakteriemi, plísněmi, kvasinkami a viry). Protilátky (imunoglobuliny) jsou heterogenní glykoproteinové molekuly s charakteristickou strukturou a specifickými vazebnými místy pro antigeny. Jsou obsažené v krevním séru a dalších tělních tekutinách, uvnitř buněk a v cytoplazmatické membráně B-lymfocytů. Antigeny jsou makromolekuly, které imunitní systém rozeznává jako cizí, díky čemuž stimulují tvorbu protilátek. Mohou mít přirozený nebo syntetický původ. Imunogen (kompletní – funkční antigen) má schopnost navodit imunitní odpověď a reagovat s lymfocyty a protilátkami –

specifitu. Nekompletní antigen je označován jako haptén, což je nízkomolekulární neimunogenní látka, která je schopná specificky reagovat s protilátkami.⁵

Serologické metody

Serologické metody jsou imunoprecipitační metody probíhající v kapalném prostředí. Mohou určovat protilátku nebo antigen, v některých případech i haptén a stanovit jejich přibližnou koncentraci. Dělí se na metody precipitační, nefelometrické a turbidimetrické, aglutinační a metody využívající vazbu komplementu.⁵

Precipitační metody

Slouží ke kvalitativním analýzám, provádí se na podložním sklíčku nebo v mikrozkuhavce. Na podložním sklíčku se ke kapce séra přidá kapka roztoku antigenu a sleduje se vznik precipitátu. V případě provedení ve mikrozkuhavce vzniká precipitát na rozhraní obou reaktantů.⁵

Imunonefelometrie a imunoturbidimetrie

Při smísení roztoku antigenu a protilátky dochází ke vzniku zákalu (imunokomplexu), který se měří turbidimetricky nebo nefelometricky. Turbidimetrie je optická metoda založená na měření procházejícího záření, které je zeslabené rozptylem na částicích v roztoku. Naproti tomu nefelometrie měří intenzitu difuzně rozptýleného záření na dispergovaných částicích. Vznik precipitátu má dvě fáze, nejprve vzniká rozpustný primární imunokomplex (rychlá fáze), a poté dochází k agregaci imunokomplexů a tvorbě sraženiny (pomalá fáze). Oproti klasické imunoprecipitaci se tyto dvě metody liší způsobem detekce imunokomplexu, mají vyšší citlivost a lze je automatizovat.^{5, 18}

Aglutinační metody

Jsou podstatně citlivější obdobou precipitačních metod. Odlišují se charakterem antigenu. Využívají korpuskulární antigen (aglutinogen). Pomocí známého antiséra se takto identifikují některé bakterie a různé typy erytrocytů. Aglutinogen může být integrální součástí povrchu částice (aktivní, přímá aglutinace) nebo může cizí částice přidané do reakce obalit

i pasivně (pasivní, nepřímá aglutinace). Pomocí známých aglutinogenů lze také dokazovat protilátky ve vzorku.⁵

Precipitační metody využívající vazbu komplementu

Komplement je soubor sérových glykoproteinů, které představují základní systém nespecifické humorální imunity. Složky komplementu jsou normálně neaktivní, ale v přítomnosti imunokomplexu se aktivují, což je základem těchto metod. Malý imunokomplex (antigen-protilátka) se váže na velké množství komplementu. Poté se stanovuje, zda se spotřebovalo celé množství komplementu (pozitivní komplement vázající reakci) nebo se část z něj nespotebovala (negativní komplement vázající reakci).

Imunodifuzní metody

Imunodifuzní metody jsou imunoprecipitační reakce v gelovém prostředí, založené na různé rychlosti difuze antigenů a protilátek do gelu. V případě, že do gelu difunduje jen jedna složka (obvykle antigen) jedná se o jednoduchou imunodifuzi. V opačném případě se jedná o dvojitou imunodifuzi. Jako gel se nejčastěji užívá agarosa nebo agar, který je nalitý na podložku ze skla nebo plastu. Do jedné řady jamek je následně aplikovaná protilátka a do druhé antigen. Dochází k jejich difundování gelem a v místě jejich styku vzniká precipitační reakce. Vytvoří se precipitační linie (úsečka, oblouček, prstenec nebo kruh), které se následně detekuje vizuálně nebo vybarvením barvivy reagujícími s bílkovinami. V moderních přístupech se již používají i značené protilátky (např. izotopy, enzymy). Imunodifuzní metody se používají ke kvalitativnímu (imunoelektroforéza, imunoblotting, imunofixace) i kvantitativnímu stanovení (jednoduchá lineární nebo radiální imunodifuze, elektroimunodifuze).⁵

Imunoelektroforéza

Probíhá ve dvou krocích. Nejprve se na agarovém gelu rozdělí antigeny na jednotlivé bílkovinné frakce, poté se v agarové vrstvě vyhloubí kanálek, který se naplní antisérem proti rozděleným bílkovinám. V místě styku obou látek dojde ke vzniku precipitačních linií, které se pro odečtení výsledku vybarvují. Imunoelektroforéza se používá k identifikaci bílkovin, při vhodném provedení je možno identifikovat až 30 různých bílkovin. Provádí se také v protisměrném uspořádání, které je pouze jednokrokové. Slouží k detekci antigenů s rychlejší

elektroforetickou pohyblivostí, než mají protilátky. Antigen i protilátka se umístí do jamek agarové destičky v řadách proti sobě. Blíže k anodě je protilátka. Jelikož je antigen anionem, putuje k anodě. Protilátka (s kladným nábojem) putuje působením elektroosmózy ke katodě. V případě pozitivní reakce se v místě styku obou látek vytvoří precipitační linie.⁵

Imunoblotting

Je metodou, při níž dochází k přenosu molekul z mobilní fáze (gelu) do pevné fáze (např. nitrocelulosaová membrána). Přenos je uskutečněn difuzí nebo stejnosměrným elektrickým proudem (tzv. electroblotting). Metoda probíhá ve dvou krocích, nejprve dochází k rozdělení směsi antigenů. Rozdělené frakce antigenů se poté přenesou na vhodnou matici (difuzí, tlakem nebo elektroforetický).⁵

Imunofixace

Jinak též přímá imuno elektroforéza. Provádí se tak, že se po ukončení elektroforézy směsi antigenů (na agarosovém gelu) na vlhký elektroforegram aplikují specifické protilátky. Ty difundují do gelu a tvoří příslušné imunokomplexy. Používá se ke specifické detekci jen některých protilátek. Využívá se při ní protilátka s vysokým titrem monospecifických protilátek a nanáší se pouze na tu část gelu, kde se předpokládá přítomnost příslušného antigenu.⁵

Imunodifuze

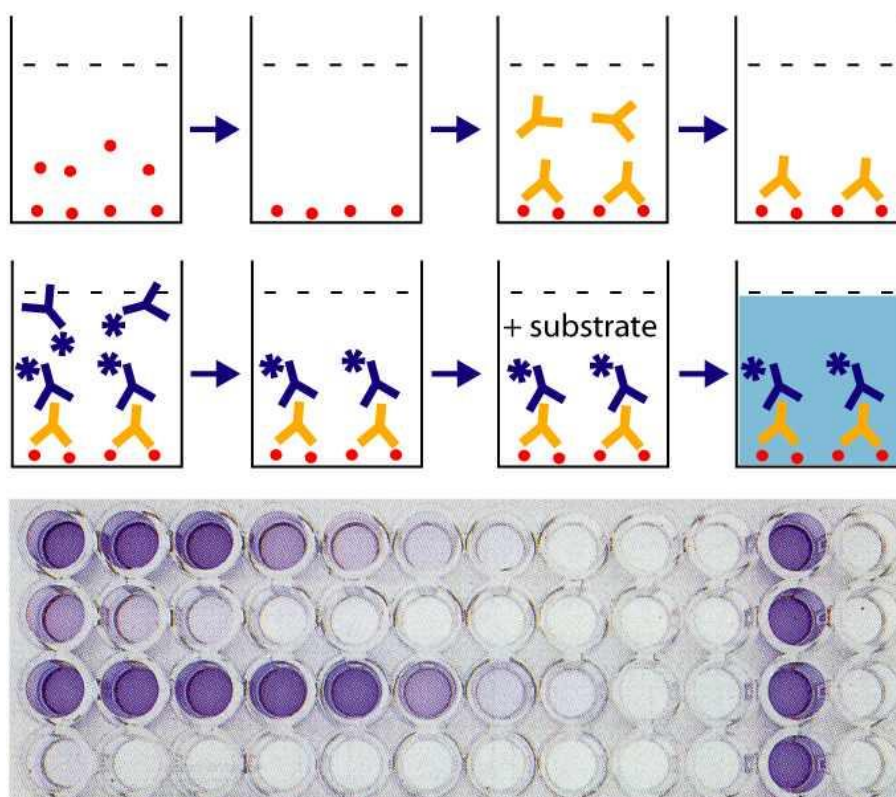
Jednoduchou lineární imunodifuzi provádíme v kapiláře nebo ve zkumavce. Roztok antigenu se navrství na sloupeček gelu obsahující specifickou protilátku proti sledovanému antigenu. Při difuzi gelem vytváří antigen precipitační prstenec a pomocí jeho vzdálenosti od místa nanesení stanovujeme koncentraci antigenu. Při radiálním provedení dochází ke kruhové difuzi roztoku antigenu z malého kruhového startu do vrstvy gelu obsahujícího specifickou protilátku. Precipitát má tvar prstence a odečet se provádí až po skončení celého procesu. Změří se průměr kruhu a vypočte se jeho plocha, která je úměrná koncentraci antigenu ve vzorku.⁵

Elektroimunodifuze

Neboli raketová imuno elektroforéza je kombinací radiální imunodifuze a elektroforézy. Probíhá v gelových vrstvách, které obsahují monospecifické protilátky. Pohyb molekul antigenu určuje stejnosměrné elektrické pole. Jde v podstatě o afinitní elektroforézu, kdy se ze směsi rozdělovaných látek zachytává jen ten antigen, který může reagovat s protilátkou nacházející se v gelu. Do jamek gelu na skleněné desce se napipetují roztoky antigenu a standardní roztoky ve stejném objemu. Deska se vloží do elektroforetické komůrky tak, aby byly jamky u opačné elektrody, než ke které putuje zkoumaný antigen. Při připojení elektrického proudu molekuly antigenu migrují do gelu a střetávají se s molekulami protilátek. Při ekvivalentním poměru vznikají precipitační útvary podobné raketám a jejich výška určuje koncentraci antigenu.¹⁹

ELISA

Neboli enzymová imunoanalýza v heterogenním prostředí spojuje specifčnost protilátek s citlivostí jednoduchých enzymových testů. Využívá reakce antigenu s protilátkou značenou enzymem. Vyhodnocení je následně založeno na barevné změně, která vzniká při reakci enzymu a substrátu. Pro její správné provedení musí být splněna řada předpokladů. Antigen nebo protilátka se vážou na povrch nerozpustného nosiče a nesmí při tom ztratit imunoreaktivitu. Enzymy použité ke značení musí mít velkou specifickou aktivitu, díky ní poté přeměňují velká množství substrátu na detekovaný produkt. ELISA je velice užitečnou metodou využívanou při stanovení koncentrace antigenu nebo protilátky. Obecně můžeme stanovení rozdělit do pěti kroků. Nejprve se do jamek mikrotitrační destičky naváže antigen. Pozice, ve kterých by mohlo dojít k nespecifické reakci, se inhibují, aby se zabránilo falešně pozitivním výsledkům. V dalším kroku se do jamek přidá primární protilátka. Předposledním krokem je přidání sekundární protilátky konjugované s enzymem. Následuje reakce substrátu s enzymem za vzniku barevného produktu (pozitivní reakce). Barevná reakce se detekuje spektrofotometricky. Princip samotné reakce a barevný produkt reakce můžeme vidět i na obrázku 4.^(20, 21, 22)



Obr. 4.: Schéma metody ELISA a vzniklý barevný produkt²³

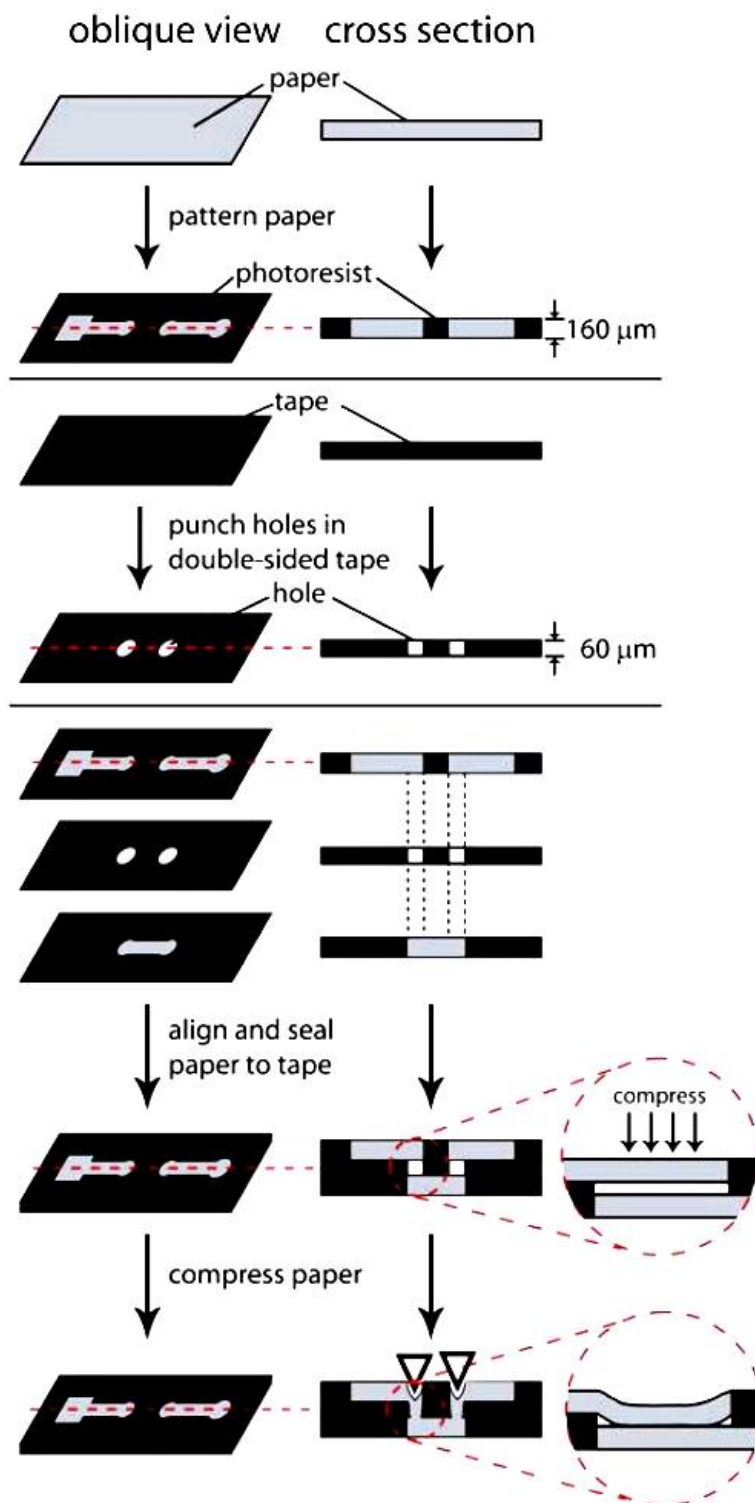
2.5 MINIATURIZACE METOD

Miniaturizace analytických metod se stala v posledních dvaceti až pětadvaceti letech velmi významnou pro řadu výzkumných skupin. Nejprve docházelo ke zmenšení analyzátorů na přístroje schopné umístění na pracovních stolech. Poté se postupně vyvíjely ruční (volně přenosné) analyzátory. V posledních letech přecházíme až k analýzám na čípech, tzv. lab-on-chip. Mikro a nanočipy jsou v současné době koncovým stádiem tohoto procesu. S miniaturizací instrumentálních metod je spojen nespočet výhod. Například snížení pořizovacích a provozních nákladů (spotřeba energie, objem reagentů, atd.) jednotlivých zařízení, snadná manipulace a ovládání, prostorová nenáročnost v laboratoři i mimo ni. Veškeré tyto aspekty tedy vedou hlavně k ekonomické stránce jednotlivých analýz, protože čím levnější jsou náklady na provedení analýzy, tím levnější služby jsou laboratoře schopny nabízet. Je však důležité si uvědomit, že snížení ekonomických nákladů nesmí vést ke snížení kvality získaných výsledků. Proto jsou veškerá miniaturizovaná zařízení vyvíjena tak, aby byla schopna svými detekčními limity a dalšími analytickými charakteristikami konkurovat již dříve zmiňovaným instrumentálním metodám.²⁴

2.5.1 Využití miniaturizovaných zařízení v praxi

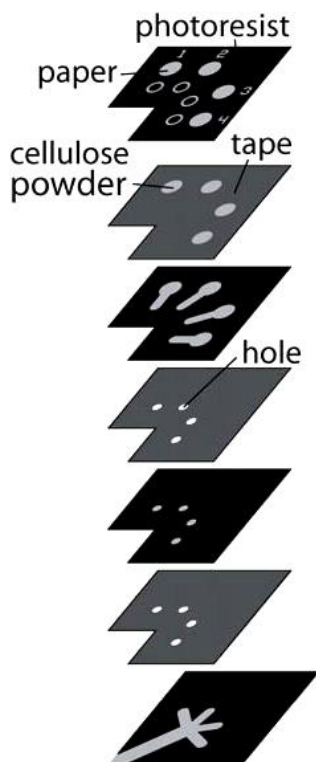
Čipy bývají nejčastěji vyrobeny z inertního materiálu (sklo či plast). V této kapitole se však zaměřím na zařízení sestavené z papíru a pásky, což bude později i základem námi konstruovaného zařízení. Výzkumná skupina okolo profesora Whitesidese z Harvardské Univerzity se již několik let zabývá konstrukcí papírových mikrofluidních zařízení pro použití v analýzách týkajících se lidského zdraví (lékařská diagnostika, kvalita vody a potravin). Jejich hlavním cílem bylo sestavit zařízení umožňující tyto analýzy v rozvojových zemích. V roce 2010 se jim podařilo sestavit programovatelné mikrofluidní 3D zařízení, jehož základem byl papír umístěný do hydrofilních kanálků, ohraničených hydrofobními polymery, což korigovalo tok reagentů. Schematické znázornění tohoto zařízení je zobrazeno na obrázku 5. V principu funguje tak, že vrstvy papíru jsou odděleny oboustrannou páskou, ve které jsou otvory. Mezi vrstvami papíru v otvorech pásky je umístěný hydrofobní celulóзовý prášek, který brání průtoku. Tok reagentů ovlivňuje uživatel tak, že pomocí tlaku (vyvinutého např. propiskou) stlačí tzv. tlačítko (spoj „papír – díra v pásce – papír“), čímž

umožní průtok kapaliny skrz vrstvy, což je dobře zviditelněno ve zvětšených průřezích obrázku.²⁵

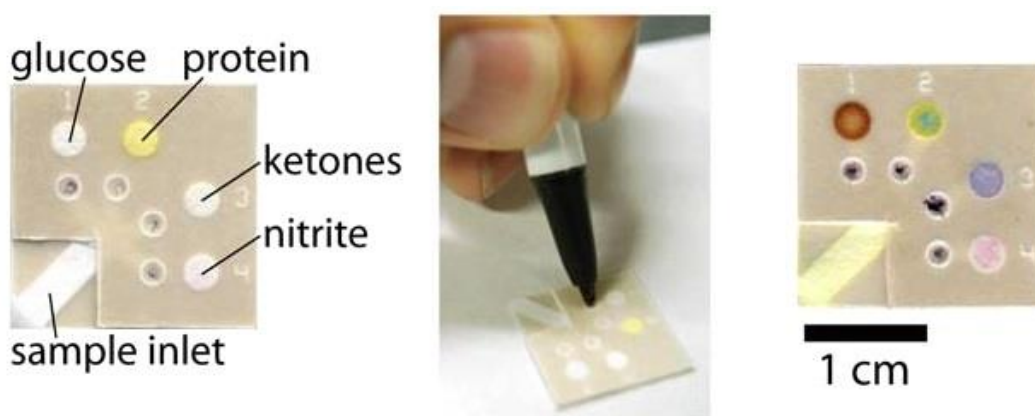


Obr. 5: Schematické znázornění 3D mikrofluidního zařízení²⁵

Na stejném principu byl sestaven čip pro stanovení glukosy, proteinů, dusitanů a ketonů v matrici moči. Na obrázku 6 je schématické znázornění skladby čipu. Obrázek 7 znázorňuje nejprve čip s nadávkovanými reagensiiemi a následně čip po provedení analýzy. Vzorek moči se známými objemy glukosy, hovězího sérového albuminu, acetoacetátu a dusitanu sodného, je dávkován v levém spodním rohu čipu. Kvalitativní zastoupení analytů bylo následně vyhodnocováno kolorimetricky.²⁵

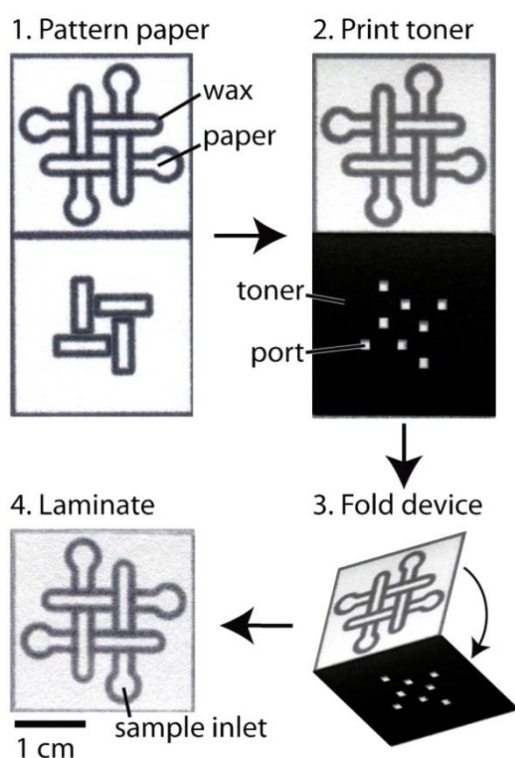


Obr. 6: Schematické znázornění čipu pro stanovení několika analytů²⁵



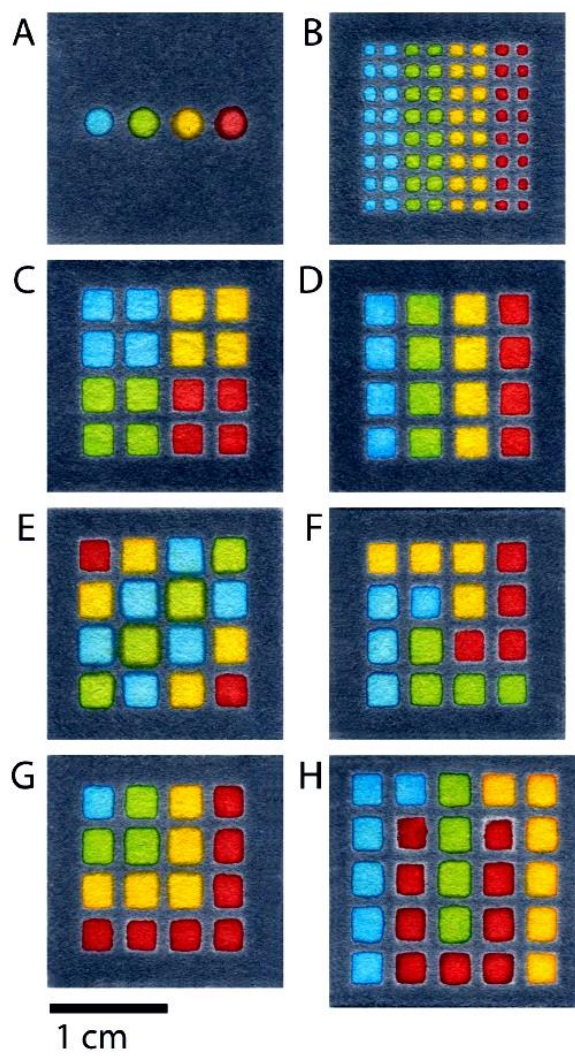
Obr. 7: Čip před a po provedení analýzy²⁵

O tři roky později (2013) Andres Martinez se svou výzkumnou skupinou publikoval vyvinutí nového přístupu ke spojování vrstev ve 3D zařízení. Jako pojídlo tentokrát využil voskový toner. Ke zhotovení tohoto zařízení využívali laminátor a laserovou tiskárnu. Toner sloužil jednak ke spojení jednotlivých vrstev papírových kanálů pro analýzu vzorku, ale taktéž jako nepropustná vrstva mezi jednotlivými pláty 3D zařízení (v původním čipu byl k tomuto použit celulózový prášek). Tímto se zároveň zmenšil počet vrstev, které je potřeba spojit. Výroba tohoto čipu zahrnuje několik kroků, jejichž znázornění je na obrázku 8. Nejprve se natiskne „šablona“, na horní plochu vzorovaného papíru se poté ve čtyřech vrstvách natiskne toner. Následně se čip složí a spojí pomocí tepelného účinku laminátoru. Tímto procesem lze spojit až osm vrstev do jednoho čipu.²⁶



Obr. 8: Znázornění procesu výroby tonerového čipu²⁶

Zařízení je možno navolit tak, aby bylo schopno analyzovat až čtyři různé vzorky několika přístupů a je možné zařadit i pozitivní a negativní kontrolu během analýz. Na obrázku 9 můžeme vidět část A zobrazující vstup čtyř vzorků v horní části zařízení do zkušební oblasti. Podle toho jakým způsobem se natisknou a propojí jednotlivé vrstvy, můžeme pozorovat odlišný tok barviv v částech B až H obrázku 9.⁽²⁶⁾



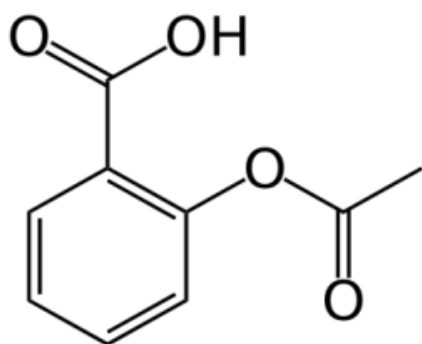
Obr. 9: Průtok barviv tonerovým čipem²⁶

2.6 LÉČIVA

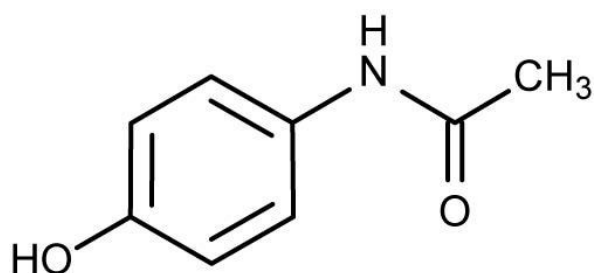
Jsou to látky, které slouží k léčení nebo předcházení nemocí. Rozdělit je můžeme na *léčivé látky* (přírodní nebo syntetické – silice, drogy, oleje), *léčivé přípravky* (které se připravují z léčivých a pomocných látek, a převádí do vhodné lékové formy – vakcíny, séra, desinfekční prostředky apod.) a *léky* (což jsou léčivé látky a přípravky upravené do formy vhodné pro konkrétní aplikaci – tablety, sirupy atd.). Podle jejich účinku je dále rozdělujeme na analgetika, anestetika, hypnotika a sedativa, chemoterapeutika a psychofarmaka. A vzhledem k praktické části této práce se ještě zmíním o antihistaminicích.^{27, 28, 29}

2.6.1 Analgetika

Jsou to látky působící proti bolesti bez ztráty vědomí. Navíc mívají antipyretický (horečku snižující), antiflogistický (protizánětlivý) a antiagregační (protisrážlivý) účinek. Analgetika se nejčastěji využívají při léčbě chřipky, nachlazení, bolestí, horečky, migrény a při snižování srážlivosti krve. Mezi analgetika s antipyretickým účinkem patří například Acylpyrin nebo Aspirin, jejichž hlavní účinnou látkou je *kyselina acetylsalicylová* (viz. obrázek 10). Analgetické účinky kyseliny salicylové jsou spojeny s tím, že blokuje enzym cyklooxygenázu. Ta syntetizuje prostaglandiny (lokální hormony), které stimulují zánět v místě svého vzniku. Zánětlivé prostředí poté působí na nervová zakončení, což se projeví bolestí. V zánětlivém ložisku navíc vznikají molekuly, které se krevním oběhem dostávají do mozku. V mozku následně spouští teplotu, při níž se imunitní systém lépe vypořádává se zánětem nebo infekcí. Podobné účinky jako kyselina acetylsalicylová má *paracetamol* neboli *acetaminophen* (viz. obrázek 11), jeho nevýhodou jsou však menší protizánětlivé účinky. Acetaminophen je účinnou látkou například v Panadolu nebo Paralenu.^{27, 29, 30, 31, 32}

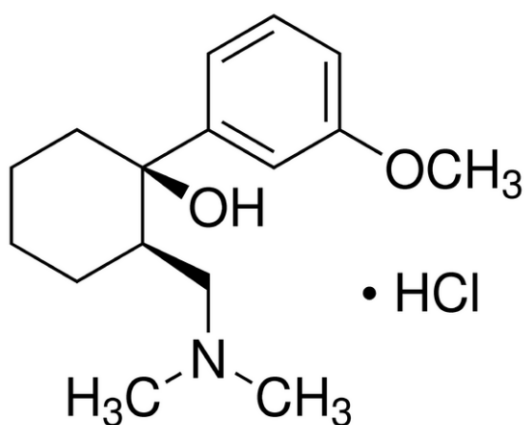


Obr. 10: Struktura kyseliny acetylsalicylové²⁹



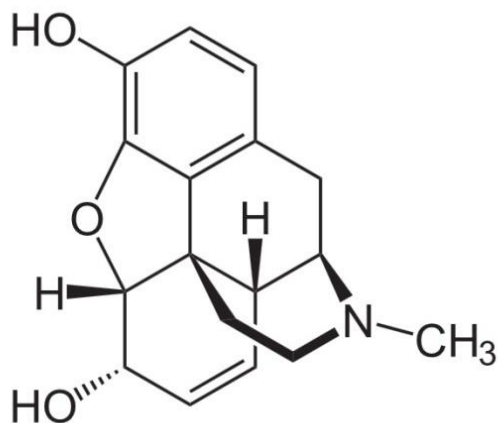
Obr. 11: Struktura acetaminophenu³³

Dalším zástupcem je Tramadol, jehož účinnou složkou je tramadol hydrochlorid. Jedná se o syntetické analgetikum patřící mezi slabé opioidy. Používá se k léčbě středně silné a silné bolesti. Struktura je zobrazena na obrázku 12.⁽³⁴⁾



Obr. 12: Struktura tramadol hydrochloridu³⁵

Dalším typem jsou analgetika morfinového typu. *Morfin* je opioidní analgetikum, které se získává z nezralých makovic a slouží k tišení silných bolestí. V průběhu léčby na něj však vniká závislost a je nutné zvyšovat dávkování. Jeho struktura je na obrázku 13.⁽²⁹⁾



Obr. 13: Struktura morfinu³⁶

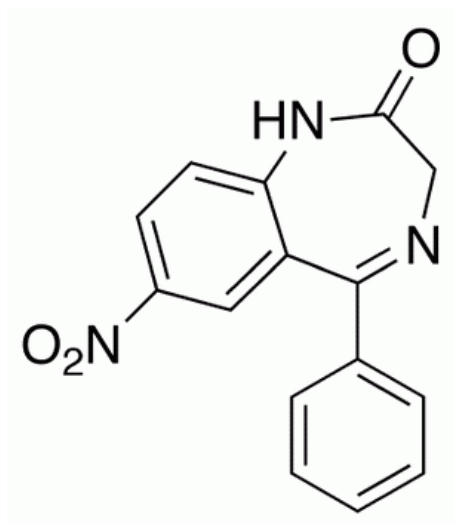
2.6.2 Anestetika

Dělíme je na celková a lokální anestetika. Celková anestetika navozují bezvědomí, nevnímání bolesti a uvolnění svalů. Používají se při narkóze. Jejich zavádění je buď inhalační, nebo intravenosní (nitrožilní). Mezi inhalační anestetika patří oxid dusný (tzv. rajský plyn), diethylether a chloroform. V současnosti se nejvíce využívá *halothan* (Narcotan), což je 2-brom-2-chlor-1,1,1-trifluorethan. Mezi intravenosní patří barbiturátové deriváty. Například *thiopental* (5-ethyl-5-(2-pentyl)thiobarbiturát). Lokální anestetika se využívají k místnímu znecitlivění, při drobných chirurgických zákrocích. Jedná se o estery p-aminobenzoové kyseliny. Nejznámějším zástupcem je *prokain* (diethylaminoethylester p-aminobenzoové kyseliny). Jeho hydrochlorid (Novokain) se ve formě roztoku aplikuje injekčně.^{29, 32, 37}

2.6.3 Hypnotika a sedativa

Jsou to látky působící na centrální nervovou soustavu. Používají se při nespavosti, strachu, stresu, nervozitě a napětí. Hypnotika vyvolávají útlum vědomí a bdělého stavu, ve vyšších dávkách spánek. Mezi hypnotika patří například Rohypnol nebo Fenobarbital.

Sedativa způsobují slabší útlum vědomí spojený s uklidněním. Nejznámějším zástupcem je Diazepam. Hypnotika mají nejčastěji strukturu barbiturátů, což jsou deriváty kyseliny barbiturové. Jedná se však o návykové látky, proto se nahrazují 2,3-dihydro-7-nitro-5-fenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-onem, který je obsažen v Nitrazepamu a není návykový (viz. obrázek 14).^{29, 38, 39}



Obr. 14: Struktura nitrazepamu⁴⁰

V těhotenství se dříve jako sedativum užíval Contergan, jehož účinnou složkou je thalidomid. Byly u něj však prokázány teratogenní účinky (vyvolával znetvoření plodu).²⁹

2.6.4 Chemoterapeutika

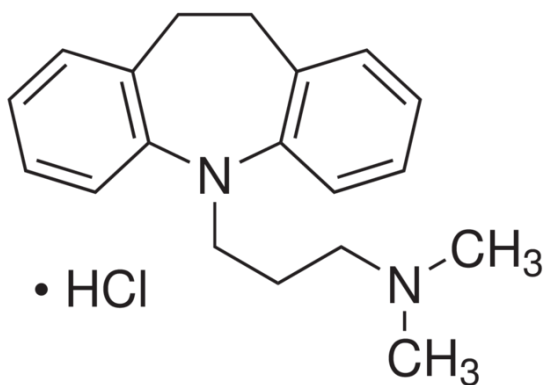
Jsou to látky, které působí proti virům, bakteriím, plísním a prvokům způsobujícím nemoci člověka. Buď je usmrcují, nebo zastavují jejich množení, aniž by vyvolávaly v těle nemocného, svými vedlejšími účinky, vážnější újmu na zdraví. Paří mezi ně například tuberkulostatika, antimalarika, antimykotika, protozoacidy atd. Dělíme je na sulfonamidy a antibiotika.^{27,29}

Sulfonamidy se používají zejména proti stafylokokovým a streptokokovým infekcím (spála, angíny, záněty). Základ jejich struktury tvoří 4-aminobenzen sulfonamid, který bývá substituován na amidovém dusíku. Nejznámějšími zástupci jsou například Sulfathiazol nebo Biseptol. *Antibiotika* jsou látky bránící růstu choroboplodných mikroorganismů. Používají se přírodní i syntetické. Slouží k léčení zápalu, zánětu a bakteriální infekce. Přírodním

antibiotikem je penicilín. Mezi syntetické patří tetracykliny, erythromycin, streptomycin apod. Zástupcem *antituberkulotik* je například kyselina 4-aminosalicylová. Nejznámějším *antimalarikem* je chinin.^{29, 38, 41}

2.6.5 Psychofarmaka

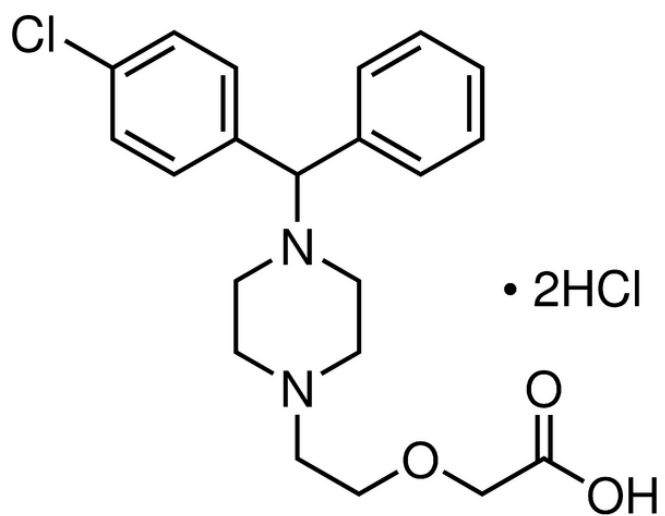
Jsou to léčiva ovlivňující psychický stav jedince. Patří mezi ně antidepresiva, antiepileptika, antimanika a dystofika (sloužící k léčbě mánií), antipsychotika a neuroleptika (sloužící k léčbě psychóz a schizofrenie) a posledním zástupcem jsou anxiolytika (pro léčbu strachů). Blíže se zde zmíním pouze o antidepresivech, konkrétně *Imipraminu*. Léčivá látka, která je v něm obsažena je imipramin hydrochlorid. Jedná se o tricyklické antidepresivum. Po podání se projevuje snížením tělesné i duševní aktivity. Jeho strukturu popisuje obrázek 15.^(32, 42)



Obr. 15: Struktura imipramin hydrochloridu⁴³

2.6.6 Antihistaminika

V praktické části budu dále provádět stanovení *cetirizin dihydrochloridu* (viz. obrázek 16), což je účinná látka obsažená například v Zodacu. Jedná se o přípravek proti alergiím. Do výše uvedeného rozdělení ji nelze přesně kategorizovat, proto ji uvádím zvlášť. Antihistaminika jsou látky, které blokují účinky látek uvolňujících se při setkání alergenu s bílou krvinkou. Ta má na sobě navázány protilátky proti konkrétnímu alergenu. Laicky řečeno jsou to látky, které omezují působení látek, které se po kontaktu s alergenem u alergického pacienta uvolňují a způsobují klinické projevy alergií.^{44, 45}



Obr. 16: Struktura cetirizin dihydrochloridu⁴⁶

3. CÍL PRÁCE

Cílem mého výzkumu bylo vyvinout čip, neboli jednoduché miniaturizované nízkonákladové zařízení, které by mohlo zastoupit složité a nákladné instrumentální metody v běžné klinické a forenzní analýze. Konkrétně pro aplikaci stanovení aktivních složek některých léčiv.

4. PRAKTICKÁ ČÁST

4.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY

K vlastní analýze byly používány čipy vytvořené z laminovací fólie, filtračního a pečicího papíru. Při jejich výrobě jsem využívala laminátor, pinzetu, řezačku, nůžky a pravítko. Při přípravě vzorků a mobilních fází jsem pracovala s automatickými pipetami s příslušnými špičkami, analytickými váhami, vialkami s víčkem, eppendorfkami a kádinkami. Při samotném stanovení jsem dále používala multikanálovou pipetu a Petriho misku. Při sušení čipu byl použit fén a pro detekci analytů byla využívána UV lampa (od společnosti P LAB).

4.2 CHEMIKÁLIE

Při testech materiálů použitých pro výrobu mikrofluidního zařízení byla využita kyselina sírová, trihydrogenfosforečná, chlorovodíková, dusičná, octová, trichloroctová a trifluoroctová. Dále hydroxid sodný a amoniak. Z organických rozpouštědel byl použit methanol, hexan, butylacetát, propanol, aceton, heptan, chloroform, cyklohexan a ethanol. Při zkouškách toku bylo využito Čugajevovo činidlo (1% ethanolický roztok diacetyldioximu) a roztok nikelnaté soli. Při testování uspořádání čipů bylo používáno potravinářské barvivo a ethanol. Pro potlačení toku reagensů byly potřebné roztoky glukosy.

Mezi chemikálie používané při samotném stanovení patřily acetaminophen, tramadol hydrochlorid, cetirizin dihydrochlorid, imipramin hydrochlorid a kyselina acetylsalicylová od společnosti Sigma-Aldrich (St. Luis, USA). K přípravě vzorků a mobilních fází byla využívána destilovaná voda, kyselina octová, cyklohexan, tetrachlormethan, diethylether, ethylacetát, amoniak a methanol. Všechny tyto chemikálie byly analytické třídy (p.a.) a pocházely od různých výrobců (Sigma-Aldrich, Merck).

4.3 PŘÍPRAVA VZORKŮ A JEJICH UCHOVÁVÁNÍ

K samotnému stanovení byly využívány účinné látky některých léčiv (viz. chemikálie). Jako standardní roztoky jsem si připravila roztoky o koncentraci 1 mg/ml. Vzorky byly rozpuštěny v příslušném rozpouštědle za laboratorní teploty. Pro přípravu roztoku acetaminophenu, tramadolu a cetirizinu byl jako rozpouštědlo použit methanol,

jelikož se jedná o látky, které jsou rozpustné v polárních rozpouštědlech. Naopak kyselina acetylsalicylová a imipramin se rozpouštěly v destilované vodě. Vzorky byly uchovávány v lednici v plastových vialkách.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 ZKOUŠKA ODOLNOSTI FILTRAČNÍHO PAPÍRU

Vzhledem k tomu že mobilní fáze, pomocí nichž jsou separovány léčiva, bývají směsí organických látek, kyselin a zásad, bylo potřeba provést zkoušku odolnosti filtračního papíru, který byl využíván k tvorbě separačních a dávkovacích kanálů v mikrofluidním zařízení. Proto jsem proužky filtračního papíru vystavila působení různých chemikálií.

Z anorganických kyselin jsem vyzkoušela:

- HCl (32%)
- CH₃COOH (99%)
- H₃PO₄ (85%)
- H₂SO₄ (48%)
- HNO₃ (65%)
- CCl₃COOH
- CF₃COOH.

Mezi testované zásadité látky patřili:

- NaOH (50%)
- NH₃ (33% aq).

A nakonec byl filtrační papír podroben působení organických rozpouštědel:

- methanolu
- hexanu
- butylacetátu

- propanolu
- acetonu
- heptanu
- chloroformu
- cyklohexanu
- ethanolu

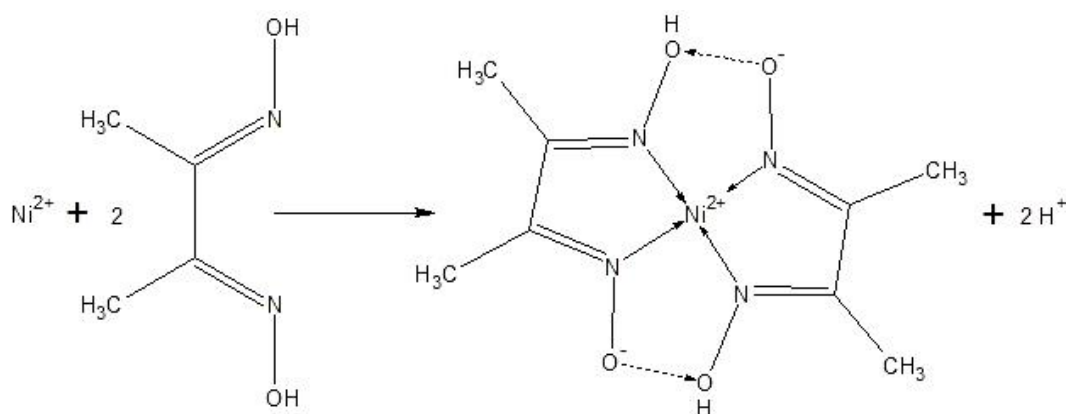
Z výše uvedených látek způsobily jeho destrukci pouze kyselina trihydrogenfosforečná, sírová a dusičná a hydroxid sodný. Ostatní chemikálie v daných koncentracích nezpůsobovaly na filtračním papíru žádné viditelné poškození.

5.2 ZKOUŠKY TOKU REAGENCIÍ FILTRAČNÍM PAPIREM

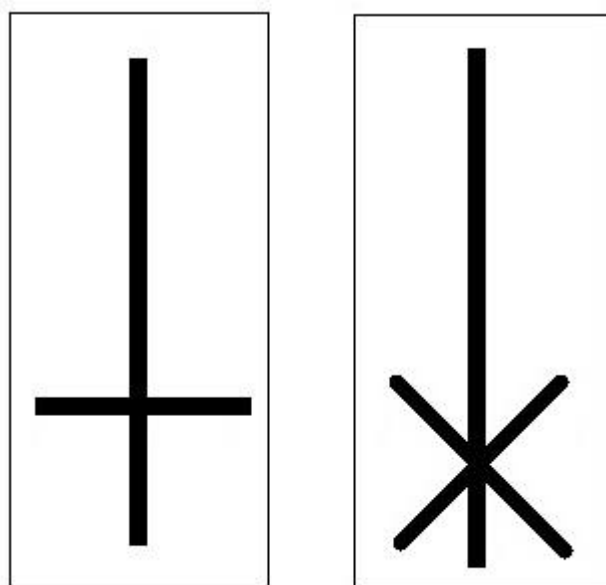
Principem analytických stanovení je reakce analytů s vhodnými reakčními činidly. Nejprve jsem tedy musela vyzkoušet, jakým způsobem provést mísení reagensů. Prvním testovaným přístupem byl čip tvořený pouze jedním kanálem. Na jednom jeho konci bylo dávkovací okénko pro vstup vzorku, na druhé straně se dávkovalo reakční činidlo. Tyto testy jsem prováděla na běžných barevných důkazových reakcích kationtů kovů (Ni^{2+} sůl a Čugajevovo činidlo). Nikelnatou sůl jsem nadávkovala na jednom konci kanálu, Čugajevovo činidlo na opačném a látky proti sobě vztlínaly. V místě jejich styku došlo k reakci, která byla viditelná díky vzniku růžového produktu (nikelnatého komplexu). Reakci popisuje rovnice 1. Druhým testovaným přístupem bylo propojení dvou a tří kanálků jejich překřížením. Toto uspořádání je schematicky znázorněno na obrázku 17.

Při dávkování vzorků jsem zjistila, že nejideálnější je dávkování reagensů ve vodorovné poloze. Když jsem dávkovala vzorek ve svislé poloze čipu, nevzlínal dostatečně. Nepodařilo se mu proto vystoupit až k místu křížení. Ve vodorovné poloze se vzorek dávkoval do nejdelšího kanálku a postupně vztlínal k místu překřížení. Jelikož byly jednotlivé kanálky zalaminovány do jednoho čipu, byly v dostatečném styku pro prostup látek

jednotlivými vrstvami. To jsem testovala opět pomocí potravinářského barviva a sledovala, jakým způsobem vzorek prostupuje jednotlivými vrstvami v místě překřížení. V „křížovém“ uspořádání jsem vyzkoušela nadávkovat vzorek (nikelnatou sůl) z jedné strany kratšího kanálu a Čugajevovo činidlo do delšího a sledovala prostup reagentů. K reakci došlo pouze zhruba v polovině nejdelšího kanálu, protože vzorek z místa překřížení postupoval všemi směry. Nakonec jsem do „hvězdicového“ uspořádání nadávkovala Čugajevovo činidlo do pěti pozic (čtyři konce kratších kanálků a spodní část delšího kanálu) a roztok nikelnaté soli nechala postupně vzlínat od nejvzdálenější části k místu překřížení a dále jednotlivými kanálky. V místě styku byla reakce detekována vznikem růžového produktu nikelnatého komplexu.



Rovnice 1: Reakce Čugajevova činidla s nikelnatou solí⁴⁷



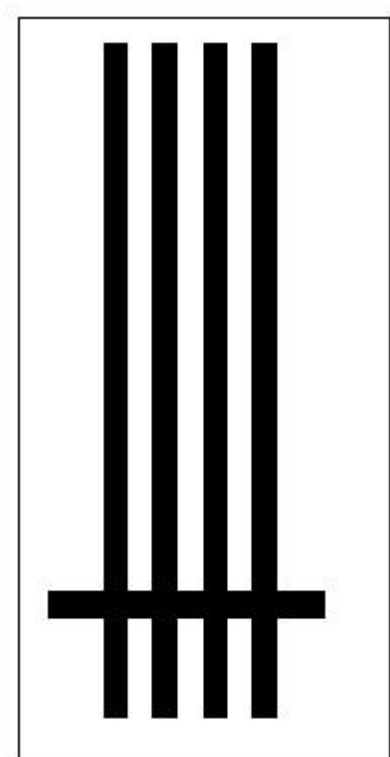
Obr. 17: Schématické znázornění křížení reakčních kanálků

5.3 POPIS MIKROFLUIDNÍHO ZAŘÍZENÍ A VOLBA DÁVKOVÁNÍ VZORKU

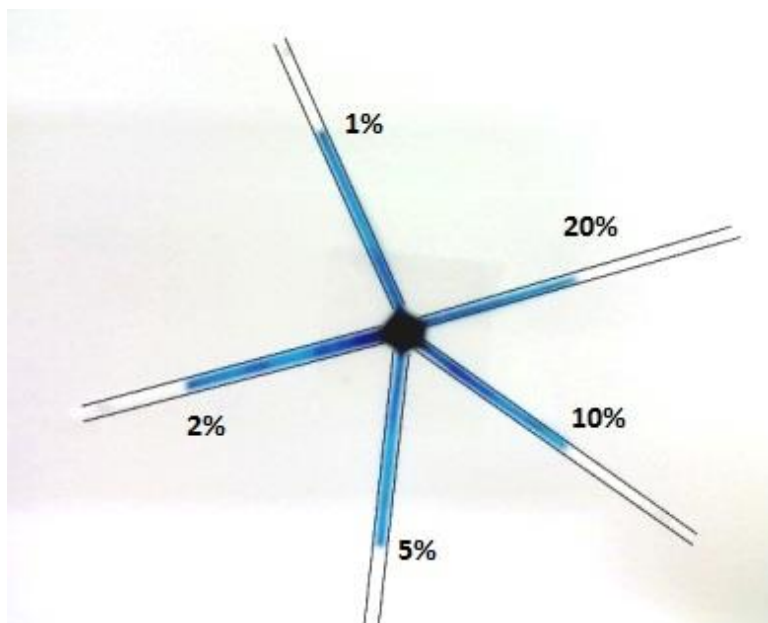
Mým úkolem bylo vyvinout nízkonákladové mikrofluidní zařízení pro analýzu léčiv v klinické a forenzní analýze. Ideou bylo vyvinout takové zařízení, které by bylo schopno provést souběžně několik stanovení v jednom vzorku. V potaz bylo vzato několik hlavních podmínek. V běžné praxi jsou vzorky k dispozici pouze v omezeném množství a mají různý charakter. Analýza by měla být rychlá a hlavně snadno proveditelná, ideálně v laboratoři i mimo ni.

Jako materiál pro sestavení čipu jsem zvolila filtrační papír, který byl uzavřen do laminovací fólie. Analýza se prováděla na principu papírové chromatografie. S vedoucím práce jsme si stanovili, že bychom chtěli vyvinout zařízení, které bude schopno provést 4 různé analýzy na jednom vzorku, což obnášelo nutnost 4 separačních (reakčních) kanálů, do kterých jsme zkoušeli zavádět vzorek. Přímé dávkování vzorku do separačního kanálu se neosvědčilo, jelikož vzorek vzlínal v obou směrech od dávkovacího místa a byl nadávkován v příliš silné vrstvě. Další variantou bylo dávkování vzorku přes dávkovací kanál, který byl v přímém styku se separačními kanály a byl fixován uvnitř čipu (zalamínován

dovnitř, stejně jako separační kanály). Schématické znázornění tohoto uspořádání je na obrázku 18. Testování toku vzorku v tomto uspořádání, bylo nejprve sledováno na potravinářském barvivu. Toto dávkování se také nejevilo jako optimální. Vzorek sice po nadávkování prostupoval dávkovacím kanálem, ale zároveň vzlínal prvním separačním kanálem dříve, než se nadávkoval do druhého a takto to postupovalo dále. Čistě teoreticky by tedy vzorek dovzlínal do horní poloviny prvního separačního kanálu a teprve poté by byl nadávkován do posledního. Toto úskalí jsem zkoušela vyřešit potlačením toku vzorku roztoky glukosy o různé koncentraci. Konkrétně jsem pracovala s roztoky o koncentraci 20%, 10%, 5%, 2% a 1% hm. Proužky filtračního papíru byly napuštěny roztoky glukosy těchto koncentrací, zalaminovány a opět byl studován tok barviva. Brždění toku jednotlivými roztoky popisuje obrázek 19. Nejkoncentrovanější roztok glukosy potlačoval tok barviva nejvíce, naopak nejméně koncentrovaný jej potlačoval nejméně. Potlačování toku tedy klesalo s klesající koncentrací roztoků glukosy.



Obr. 18: Schématické znázornění čipu s fixním dávkovacím kanálem



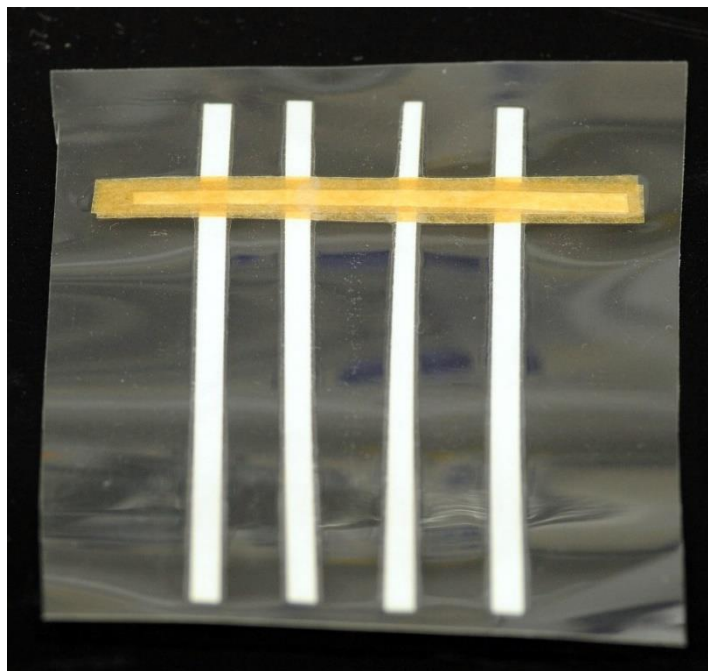
Obr. 19: Brždění toku reagentů pomocí roztoků glukosy

Nabyté poznatky o toku kapaliny uvnitř kanálu a brždění toku pomocí různých koncentrovaných roztoků glukosy jsem poté aplikovala při volbě tloušťky a délky jednotlivých kanálů. Když jsem chtěla provést analýzu na čipu, aniž by byl sycen roztokem glukosy, musela jsem volit dvojnásobnou délku a poloviční průměr prvního separačního kanálu oproti druhému a takto postupovat dále, aby vzorek se vzorek rovnoměrně nadávkoval. Dále jsem vyzkoušela, na čipu obsahujícím pouze dva separační kanály a jeden dávkovací, použití 20% (hm.) roztoku glukosy. Vzorek se dávkoval rovnoměrně do obou kanálů v případě, že byl první (nejblíže k místu dávkování) sycen tímto roztokem a druhý nebyl nijak upravován. Tato řešení by však byla pro praktické využití komplikovaná. Čip by se musel vyrábět s kanály, které by již byly nasycené roztoky glukosy o různých koncentracích, což by mohlo znemožňovat jeho využití při některých klinických či forenzních aplikacích. Koncentrace roztoku glukosy by musela klesat ve směru dávkování vzorku.

Zcela odlišným způsobem dávkování vzorku je dávkování otiskem. Mezi dávkovací a separační kanály jsem do čipu zalaminovala pruh pečicího papíru. Ten jsem volila proto, že když jsem do dávkovacího kanálu dávkovala roztok vzorku, nepropouštěl jej do separačních kanálů a navíc nepřilnul k laminovací fólii. Při dávkování vzorku jsem tedy postupovala následovně. Po zalaminování čipu jsem vytvořila dávkovací okénko pro vstup vzorku z jedné strany dávkovacího kanálu. Pomocí automatické pipety jsem nadávkovala

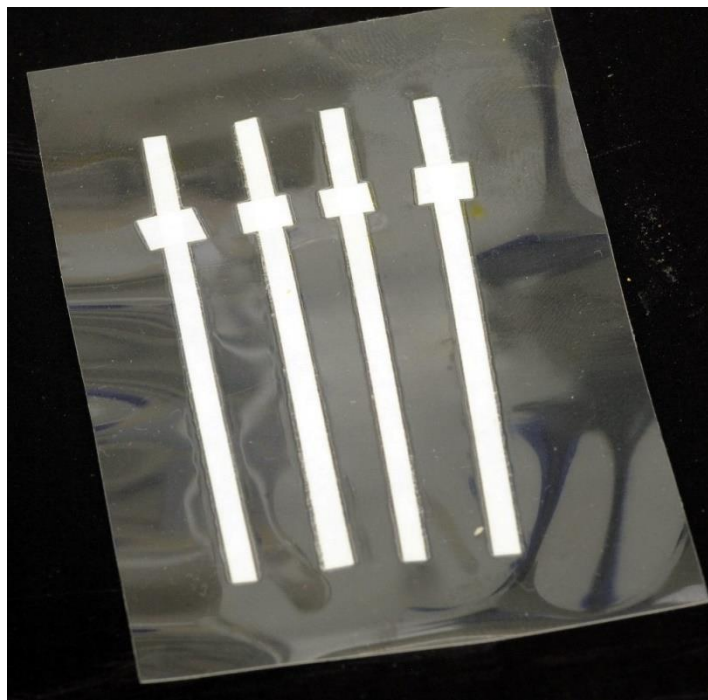
roztok nikelnaté soli a nechala jej projít skrz celý kanálek. Poté jsem odstranila pečící papír, čímž došlo k otištění vzorku do separačních kanálů. Dále jsem ve spodní části čipu vytvořila otvory pro vstup Čugajevova činidla. Tento přístup, už se jevil jako lepší, akorát by pomocí něj nešlo stanovovat vzorek odlišnými činidly. Přes dávkovací kanálek by totiž mohlo docházet k jejich mísení, což by celou analýzu znehodnotilo. Proto jsem usoudila, že nejideálnější by byla varianta, kdy by se po nadávkování vzorku dávkovací kanál vyjmul. Princip takového zařízení je popsán v následujícím odstavci.

Obrázky 20 a 21 zobrazují čipy pro analýzu analytů rozpustných v různých rozpouštědlech a zároveň zobrazují 2 různé přístupy dávkování vzorku. Čip na obrázku 20 jsem používala při analýze netěkavých vzorků. Nejprve si vysvětlíme jak zařízení a hlavně způsob dávkování funguje. Zařízení je sestaveno ze čtyř separačních papírových kanálů a jednoho dávkovacího. Dávkovací kanál slouží k zavádění vzorku do separačních kanálů. Tento kanál je umístěn mezi vrstvu dvou pečících papírů. Pečící papír má dvě hlavní funkce odděluje dávkovací a separační kanály a umožňuje vyjmutí dávkovacího kanálu. Jeden jeho proužek je umístěn mezi dávkovací a separační kanály. Vzorek se nejprve aplikuje do dávkovacího kanálu, poté se vyjme vrstva pečícího papíru a otiskem se vzorek převede do separačního kanálu, což je stejný princip jako při metodě dávkování popsané v předešlém odstavci. Druhá vrstva papíru je vložena mezi laminovací fólii a dávkovací kanál, čímž brání jeho přilnutí a umožňuje jeho vyjmutí před samotnou analýzou. Vzhledem k tomu, že cílem bylo vytvořit zařízení schopné několika různých analýz na jednom vzorku, musí se dávkovací kanál odstranit, aby skrz něj nedocházelo k mísení různých mobilních fází, či reagentů. Jakmile je vzorek nadávkován do separačních kanálů, aplikujeme mobilní fáze pomocí multikanálové pipety (skalpelem si vytvoříme vstupy pro jednotlivé reagenty) nebo čip ve spodní části nastříháme a necháme směs rozpouštědel vzlínat (na obrázku 20 je dávkovací prostor v horní části). V případě „vzlínací“ techniky je směs rozpouštědel (mobilní fáze) v Petriho misce a čip se do ní umístí tak, že se opře o hranu misky. Je však potřeba dávat pozor, aby hladina mobilní fáze nedosahovala výše dávkovací části čipu. Mobilní směs se nechá vzlínat (ať se dávkuje jakkoliv) a po ukončení analýzy se zaznačí vzdálenost, kterou urazilo čelo rozpouštědla.



Obr. 20: Mikrofluidní zařízení pro analýzu ve vodě rozpustných analytů

Druhým přístupem pro dávkování těkavých vzorků je dávkování přes mezivrstvu, které je znázorněno na obrázku 21. Vzorek se vpravuje přes otvor, který si opět vytvoříme pomocí skalpelu. Dávkování skrz mezivrstvu volíme proto, že když se vzorek dákoval přímo do separačního kanálu, vzlínal z dávkovacího prostoru v obou směrech a rozmýval se. Dávkování přes mezivrstvu zajistí menší objem vzorku, který přes ni projde do separačního kanálu a tím se eliminuje výše zmíněný problém. Co se týče dávkování reagentů, opět probíhá přes „okýnka“, které se vyřežou pod dávkovací částí pomocí skalpelu nebo vzlínáním. Po ukončení analýzy se opět zaznačí vzdálenost, kterou urazilo čelo mobilní fáze v jednotlivých kanálcích, což se poté využívá k výpočtu retenčních faktorů při vyhodnocování analýzy.



Obr. 21: Mikrofluidní zařízení pro analýzu analytů rozpustných v těkavých rozpouštědlech

5.4 VOLBA MOBILNÍCH FÁZÍ

První vyzkoušenou mobilní fází byla směs *octan etylnatý – methanol – amoniak* (v poměru 32:4:2). Nalila jsem ji na Petriho misku a umístila do ní čtyřkanalový čip, kterému jsem ustříhla spodní část, čímž jsem vytvořila otvory pro vstup mobilní fáze. Mobilní fáze vzlínala jednotlivými kanály, bez problému prostoupila skrz dávkovací část pro vzorky a postupovala dále. Z důvodu dobré viditelnosti jsem tuto směs zkoušela aplikovat i pro separaci potravinářského barviva. Nedošlo k jeho separaci, pouze vystoupilo zároveň s čelem rozpouštědla a rozpilo se přes celý separační kanál od místa nadávkování až po čelo rozpouštědla (což je vzdálenost, kterou mobilní fáze urazila v separačním kanálu od místa vstupu). Stejnou analýzu jsem vyzkoušela s použitím čistého ethanolu jako mobilní fáze. Ethanol již potravinářské barvivo rozseparoval na jednotlivé složky.

Jelikož jsme se rozhodli provést analýzu aktivních složek léčiv (acetaminofenu, tramadol hydrochloridu, cetirizin dihydrochloridu, imipramin hydrochloridu a kyseliny acetylsalicylové) dohledali jsme v literatuře vhodné mobilní fáze pro jejich stanovení. Veškeré analýzy byly provedeny v univerzální mobilní směsi využívané pro stanovení léčiv *cyklohexan – octan ethylnatý – amoniak* (v poměru 20:20:1). Stanovení acetaminofenu bylo provedeno taktéž v mobilní směsi *octan ethylnatý – amoniak* (v poměru 40:0,5), která je určena přímo pro stanovení paracetamolu chromatografickými technikami. A pro stanovení kyseliny acetylsalicylové byla použita mobilní fáze *kyselina octová – cyklohexan – tetrachlormethan – amoniak* (v poměru 5:10:10:5). Veškeré mobilní fáze byly připravované čerstvé pro každé měření. Není vhodné je uchovávat, jelikož se jedná o směsi těkavých organických rozpouštědel.⁴⁸

5.5 DETEKCE ANALYTŮ

K detekci jednotlivých analytů byla zvolena UV lampa s vlnovými délkami 254 a 366 nm a intenzitou zářivky 500/550μW od společnosti P LAB. Léčiva pod UV lampou fluoreskují. Proto jsem čip po ukončení analýzy umístila pod UV lampu, vyzkoušela na něj zasvítit světlem s oběma vlnovými délkami a v případě, že byla viditelná skvrna léčiva, zaznačila jsem její vzdálenost, kterou urazila od dávkovacího prostoru. Vzdálenost čela rozpouštědla a léčiva se poté využívala k výpočtu retenčního faktoru dané látky. Ten je dán podílem vzdálenosti středu skvrny separovaného léčiva (a) a vzdálenosti čela rozpouštědla od dávkovacího prostoru (b) a je to bezrozměrné číslo.⁴⁹

$$R_f = \frac{a}{b}$$

5.6 ANALÝZA LÉČIV V UNIVERZÁLNÍ MOBILNÍ FÁZI

Nejprve jsem provedla analýzu léčí v univerzální mobilní fázi (cyklohexan – octan ethylnatý – amoniak v poměru 20:20:1). Tabulka 1 prezentuje retenční faktory jednotlivých analytů, jedná se o průměr ze tří měření. Detekce analytů byla provedena při vlnové délce 254 nm. U acetaminophenu a kyseliny acetylsalicylové byla patrná výrazná fluorescence. U tramadol hydrochloridu, cetirizin dihydrochloridu a imipramin hydrochloridu byla patrná jen velice slabá fluorescence, která však nebyla dostatečná pro odečtení vzdálenosti skvrny. Proto u těchto látek retenční faktory neuvádím. Veškeré zkušební měření byly prováděny na standardech o koncentraci 1 mg/ml, jelikož jsme potřebovali na čistých látkách prokázat funkčnost námi vyvinutého mikrofluidního zařízení. Univerzální mobilní směs je zároveň i mobilní směsí, která je optimální pro analýzy ipramin hydrochloridu. V našem koncentračním rozsahu se nám jej však nepodařilo detekovat.

analyt	vzdálenost analytu	vzdálenost čela	R_f
	od startu (cm)	rozpouštědla (cm)	
acetaminophen	1,5	2,6	0,58
acetylsalicylová kyselina	2,2	2,8	0,79
tramadol hydrochlorid	-	3,3	-
cetirizin dihydrochlorid	-	2,9	-
ipramine hydrochlorid	-	3,2	-

Tabulka 1: Retenční faktory léčiv

5.7 JINÉ MOBILNÍ FÁZE

Acetaminophen jsme analyzovali taktéž v mobilní směsi složené z octanu ethylnatého a amoniaku (v poměru 40:0,5), která je pro jeho stanovení běžně užívaná. Nepodařilo se nám však detekovat skvrnu analytu. Stejný problém byl při stanovování kyseliny acetylsalicylové v mobilní směsi tvořené kyselinou octovou, cyklohexanem, tetrachlormethanem a amoniakem (v poměru 5:10:10:5). Proto budu dále zkoušet ještě detekci

pomocí „zviditelňujících“ činidel, která budou aplikována do čipu po provedení separace. Tento přístup zatím vyvíjím. Prozatímni, zatím nevyzkoušenou, ideou je, že se do čipu vedle separačního kanálu zalaminuje ještě další, který bude případně sloužit k zavádění zviditelňujícího činidla nebo jím bude napuštěn. V případě potřeby se poté tlakem nebo jinou metodou zprostředkuje přenos tohoto činidla do separačního kanálu, aby pomohlo při detekci analytů, které nejsme schopni odečíst pod UV lampou.

5.8 VYHODNOCENÍ

Vzhledem k tomu, že nejsou k dispozici souhrnné tabulky, které by obsahovaly retenční faktory jednotlivých léčiv analyzovaných v různých mobilních fázích, vyhodnocení reálných vzorků by se provádělo porovnáváním získaných výsledků z klinických či forenzních vzorků s výsledky získanými měření čistých standardů. V případě zavedení těchto analýz do praxe, by se mohly vytvořit knihovny retenčních faktorů standardů různých léčiv o rozdílných koncentracích. Každé léčivo by mělo retenční faktor vztažený k analýzám v různých mobilních fázích a v různých koncentračních hladinách.

6. ZÁVĚR

Výsledkem mého výzkumu je mikrofluidní zařízení vyrobené z laminovací fólie a filtračního papíru. Toto zařízení je schopno provádět čtyři jednoduché analýzy v rámci jednoho testu. Analýza je založena na principech papírové chromatografie. Konkrétně jsem jeho aplikaci testovala pro klinickou a forenzní diagnostiku. Zaměřila jsem se na studium některých aktivních látek obsažených v běžně užívaných léčivech.

Hlavními výhodami tohoto zařízení jsou velice nízké výrobní náklady, krátká doba analýzy a malá spotřeba vzorku i jednotlivých reagensů, což výrazně snižuje celkovou cenu analýzy. Se zařízením lze, díky jeho rozměrům, snadno manipulovat a k jeho obsluze nejsou potřeba žádné specifické znalosti.

Při testování jeho vlastností, průtoků kapaliny a dávkování vzorku jsme jej užili také pro důkazové reakce analytických iontů či separaci potravinářského barviva, což jen dokazuje široké spektrum jeho využití. V podstatě se jedná o zařízení, na kterém je analytik schopen provést čtyři různé analýzy na jednom vzorku. Záleží pouze na něm, jaké testy zvolí. Jediným omezením jsou způsoby detekce. Jelikož je celé zařízení uzavřeno v laminovací fólii není možné provést detekci např. postřikem detekčním činidlem, což se běžně využívá pro zviditelnění skvrn při tenkovrstevné chromatografii. Nejideálnějším přístupem je vizuální detekce pod UV lampou, kterou jsme pro aplikaci stanovení léčiv využili.

V budoucnu bych dále ráda zkusila sestavit mikrofluidní zařízení, které bude mít aplikováno detekční činidlo v sousedním separačním kanálu, tak aby se použilo jen v případě jeho potřeby. A druhým zařízením by mohl být bezpapírový čip, který se budu pokoušet spojit s některými instrumentálními metodami.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Vacek J.: Klin. Biochem. Metab. 4, 25-30 (2006).
2. <https://managementmania.com/cs/forenzni-veda-forenzika-forensics.pdf>, staženo 2.3.2014
3. Rážová I.: *Využití absorpční molekulové spektroskopie ve forenzní analýze*. Bakalářská práce, Masarykova Univerzita, Brno 2010.
4. Krajník v. a kol.: *Kriminalistika*, A PZ v Bratislave, Bratislava 2012.
5. Chromý V. Fischer J.: *Analytické metody v klinické chemii*, Masarykova Univerzita, fakulta přírodovědecká, Brno 2000.
6. Caroli S., Záray G.: *Analytical techniques for clinical chemistry: methods and applications*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken 2012.
7. Stuart B. H.: *Forensic analytical techniques*. John Wiley & Sons, Ltd., 2013.
8. <http://www.vscht.cz/anl/lach2/GC.pdf>, staženo 2.3.2014
9. Smith M. L., Vorce S. P., Holler J. M., Shimomura E., Magluilo J., Jacobs A. J., Huestis M. A.: *Journal of Analytical Toxicology* 31, 237-253 (2007).
10. Hárendarčíková L.: *Analýza uměleckých předmětů spektrálními metodami*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2012.
11. Norková R., Jaklová Dytrtová J., Kašička V.: *Chemické listy* 949-955 (2013).
12. Heiger D.: *High performance capillary electrophoresis*. Agilent Technologies, Germany, 2009.
13. Kašička V.: *Chem. Listy* 91, 320-329 (1997).
14. Štulík K., Zima T.: *Klinická a toxikologická analýza*. VŠCHT, Praha 2008.
15. <http://www.chemicool.com/img1/graphics/ir.gif>, staženo 14.4.2014
16. http://biomolecules.mff.cuni.cz/media/img/labs/roa_fig1.gif, staženo 14.4.2014
17. Stůžka V.: *Analytická atomová optická spektrometrie*. Univerzita Palackého, Olomouc, 2000.
18. Štern P.: *Klinická chemie a metabolismus* 3, 146-151 (2006).
19. Káš J., Kodíček M., Valentová O.: *Laboratorní techniky biochemie*. VŠCHT, Praha 2006.
20. <http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/ELISA-Principle>, staženo 10.4.2014

21. http://biochemie.upol.cz/doc/skripta/kbc/Imunochemicke_metody.pdf, staženo 10.4.2014
22. http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/551/ustav_551/aplikace/soubory/metody_elisa.pdf, staženo 10.4.2014
23. http://virus.usal.es/web/demo_microali/enterotoxina/imagenes/portada.jpg, staženo 10.4.2014
24. Kricka J. L.: Clinical chemistry 44:9, 2008-2014 (1998).
25. Martinez A. W., Phillips S. T., Nie Z., Cheng Ch., Carrilho E., Wiley B. J., Whitesides G. M.: Lab on a Chip 10, 2499-2504 (2010).
26. Martinez A. W., Schilling K. M., Jauregui D.: Lab on a Chip 13, 628-631(2013).
27. <http://chemie-kvarta.wz.cz/leky-a-leciva.html>, staženo 6.4.2014
28. Fusek M., Vitek L., Blahoš J., Hajdúch M., Ruml T. a kol.: *Biologická léčiva: teoretické základy a klinická praxe*. Grada, Praha 2012.
29. <http://www.gymelg.cz/sites/default/files/chemie/Leciva.pdf>, staženo 6.4.2014
30. <http://leciva-leky.nasclovek.cz/analgetika-antipyretika-antiflogistika/>, staženo 6.4.2014
31. Vlček J., Fialová D. a kol.: *Klinická farmacie I*. Grada, Praha 2010.
32. Lüllmann H., Mohr K., Wehling M.: *Farmakologie a toxikologie*. Grada, Praha 2004.
33. <http://0.tqn.com/d/chemistry/1/0/t/M/1/paracetamol.jpg>, staženo 6.4.2014
34. <http://www.tribune.cz/clanek/10817>, staženo 6.4.2014
35. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/uc456?lang=en®ion=CZ>, staženo 6.4.2014
36. <http://www.heritagedaily.com/wp-content/uploads/2013/07/mjack2.jpg>, staženo 6.4.2014
37. <http://leciva-leky.nasclovek.cz/celkova-anestetika/>, staženo 6.4.2014
38. Martínková J. a kol.: *Farmakologie pro studenty zdravotnických škol*. Grada, Praha 2007.
39. <http://leciva-leky.nasclovek.cz/sedativa-hypnotika/>, staženo 6.4.2014
40. http://www.apiapollo.com/img/Nitrazepam_Molecular.png, staženo 6.4.2014
41. <http://leciva-leky.nasclovek.cz/antibiotika/>, staženo 6.4.2014
42. <http://leciva-leky.nasclovek.cz/psychofarmaka/>, staženo 6.4.2014

43. <http://www.mpbio.com/images/product-images/molecular-structure/02190218.png>,
staženo 6.4.2014
44. <http://www.zentiva.cz/our-products/pages/html-leaflet.aspx?ItemId=1871>, staženo
6.4.2014
45. <http://www.zodac7.cz/default.aspx/cz/chc/zodac1/default/menu/lecba/lecbaaleky>,
staženo 6.4.2014
46. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c3618?lang=en®ion=CZ>,
staženo 6.4.2014
47. http://www.studiumchemie.cz/materialy/img_pokusy/cugajev_2.png, staženo
18.4.2014
48. Večerková J.: *Postupy při záchytu a identifikaci léčiv a jejich metabolitů
v biologickém materiálu pomocí chromatografie na tenkých vrstvách*. Státní
pedagogické nakladatelství, Praha 1983.
49. http://chemie.ocikvideni.cz/ZS/11_chromatografie.pdf, staženo 19.4.2014

8. SEZNAM ZKRATEK

AAS	atomová absorpční spektrometrie
AFS	atomová fluorescenční spektrometrie
CE	kapilární elektroforéza
ELISA	enzymová imunoanalýza v heterogenním prostředí
GC-QMS	plynový chromatograf s kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem
GC-MS-MS	plynová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
ICP-MS	hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem
IEC	iontově výměnná chromatografie
LC-MS	kapalinový chromatograf s hmotnostní detekcí
RP-HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi
UV	ultrafialové