

Abstrakt

Štandardný heparín, klinický antikoagulant, je v praxi čoraz častejšie nahradený nízkomolekulárnymi heparínmi. Tie sa používajú kvôli lepším biologickým vlastnostiam, medzi ktoré patrí lepšie predvídateľný antikoagulačný účinok, menej krvácavých komplikácií a lepšia biologická dostupnosť. Hladina nízkomolekulárnych heparínov v krvi je zvyčajne stanovená anti-Xa testom. Toto stanovenie však naráža na isté nedostatky.

Táto práca sa venuje stanoveniu nízkomolekulárneho heparínu, Fraxiparínu, pomocou afinitnej kapilárnej elektroforézy. Pretože heparíny sú polysacharidy, ktoré významne neabsorbujú v UV oblasti, ich priama detekcia je náročná. Z toho dôvodu v rámci tejto práce bola použitá nepriama detekcia Fraxiparínu, pričom bola využitá jeho schopnosť tvoriť komplex s protamínom - antidotum heparínu. Protamín je pozitívne nabitý peptid, ktorý má zložitú štruktúru, jeho hlavnou zložkou je však arginín. Z toho dôvodu bol, z účelu stanovenia Fraxiparínu, protamín nahradený tetraarginínom, ktorý má dobre definovanú štruktúru.

Základným elektrolytom bola kyselina fosforečná s koncentráciou 9 mmol l^{-1} s prídavkom 0,1% (w/v) hydroxyetylcelulózy. Základné experimentálne usporiadanie používalo zónové dávkovanie, pričom jednotlivé zóny boli nadávkované tlakom 5 kPa. Ako prvá bola nadávkovaná zóna Fraxiparínu, hneď potom bola dávkovaná zóna tetraarginínu (5 s). Následne bolo aplikované napätie 30 kV po dobu 30 s, počas ktorého jednotlivé zóny migrujú cez seba, čím dôjde k vzniku komplexu Fraxiparín-tetraarginín. Na stanovenie Fraxiparínu bol použitý zvyškový voľný tetraarginín, ktorý bol detegovaný pri vlnovej dĺžke 200 nm. Doba dávkovania Fraxiparínu bola jeden z predmetov optimalizácie. Ďalej bola optimalizovaná celková dĺžka kapiláry, z dôvodu dosiahnutia čo najpriaznivejšej doby stanovenia. Optimalizovaná metóda používala kapiláru s celkovou dĺžkou 40,0 cm (efektívna dĺžka 31,5 cm). Fraxiparín bol dávkovaný 120 s a tetraarginín 5 s. Aby sa roztoky v kapiláre príliš nezahrievali separačné napätie, ktoré bolo aplikované po dobu 30 s, bolo znížené na 20 kV.

Následne boli prevedené pokusy, týkajúce sa stanovenia Fraxiparínu v krvnej plazme. Na deproteinizáciu plazmy bol testovaný acetonitril, acetón a kyselina trifluóroctová.

Kľúčové slová

kapilárna elektroforéza, nízkomolekulárny heparín, afinitná interakcia