

Abstrakt

Heparin je kyselá směs sulfatovaných polysacharidů (glykosaminglykanů) s velkou hustotou záporného náboje nacházející se přirozeně v lidském organismu. Díky své schopnosti vázat se na antithrombin III a tím urychlovat inhibici thrombinu má silné antikoagulační účinky, čehož se hojně využívá v klinické praxi při operacích, emboliích či infarktu myokardu. Protamin je naopak směs malých bazických peptidů využívaná jako antidotum při předávkování heparinem. To je možné díky elektrostatické interakci kladně nabitého protaminu se záporně nabitým heparinem. Této interakce se též využívá pro stanovení heparinu v plazmě či krvi pomocí afinitních metod. V rámci práce bylo zjištěno, že pokud jsou protamin s heparinem smíchány v jedné vialce, tvoří komplex, jehož výsledný náboj je dán vzájemným poměrem koncentrací protaminu a heparinu. Naopak v případě, že se protamin dávkuje jako vzorek a heparin je přidán do základního elektrolytu jako ligand vázající protein, je možné z úbytku plochy píku protaminu stanovit koncentraci heparinu. Kvůli složitosti interakce protaminu s heparinem byl pro zvýšení opakovatelnosti měření použit tetraarginin jako protaminu strukturně blízký model. Byla optimalizována metoda, která využívá 20 mM, resp. 60 mM kyselinu fosforečnou jako základní elektrolyt, roztok tetraargininu o koncentraci 1 mg/ml, jehož úbytek se pozoruje, a UVdetekce při 200 nm. Měření je prováděno v křemenné kapiláře o vnitřním průměru 50 μm a délce 50,0 resp. 41,5 cm, při teplotě 25 $^{\circ}\text{C}$. Po nadávkování protaminu je na systém vloženo napětí 30 kV po dobu 30 s, poté je systém mobilizován tlakem 5 kPa. Ve 20 mM kyselině fosforečné je dosaženo limitu detekce 1,9 $\mu\text{g/ml}$, limitu kvantifikace 6,3 $\mu\text{g/ml}$ a horní meze lineárního dynamického rozsahu 29,5 $\mu\text{g/ml}$ při relativní standardní odchylce plochy píku tetraargininu bez přídavku heparinu 0,9 % ($n = 10$). V 60 mM kyselině fosforečné je dosaženo limitu detekce 0,9 $\mu\text{g/ml}$, limitu kvantifikace 2,9 $\mu\text{g/ml}$ a horní meze lineárního dynamického rozsahu 16,9 $\mu\text{g/ml}$ při relativní standardní odchylce plochy píku tetraargininu bez přídavku heparinu 7,8 % ($n = 10$).

Klíčová slova: Heparin, protamin, tetraarginin, kapilární zónová elektroforéza, afinitní elektroforéza