

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Barbora Filounová

Nepřímé stanovení heparinu kapilární elektroforézou

Indirect determination of heparin by capillary electrophoresis

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D.

Praha 2018

Prohlášení

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

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 13. května 2018.

Abstrakt

Heparin je směs sulfatovaných polysacharidů s negativním nábojem. Jde o látku, která je v organismu velmi důležitá a zásadním způsobem zasahuje do jeho fyziologie. Hlavní funkce heparinu v těle je protisrážlivá – zabraňuje tomu, aby došlo k úplnému sražení krve. Zásahem do koagulační kaskády jeho antikoagulační efekt vyrovnává hemokoagulační efekt. V některých případech je třeba do této rovnováhy zasáhnout farmakologicky, kdy se aplikuje heparin ve formě sodné nebo vápenaté soli ve fyziologickém roztoku jako antikoagulační přípravek.

Sledování hladiny heparinu v krvi nebo plasmě má svá úskalí. Dodnes používané metody jsou založeny na jednoduchém principu měření času potřebného k vzniku sraženiny krve ve vzorku – vyhodnocení je prováděno vzhledem k porovnávacím roztokům. Tyto metody jsou relativně nepřesné, nedají se použít v „on-line“ uspořádání a jsou velmi ovlivňovány celkovým zdravotním stavem pacienta.

V rámci této práce byly převzaty a ověřeny některé ze základních principů metody afinitní kapilární elektroforézy, kde byl heparin sledován nepřímo pomocí úbytku píku protaminu. Protamin se používá jako antidotum heparinu, protože s ním tvoří stabilní komplex. V této práci byl složitější protamin nahrazen dobře definovaným tetraargininem, jelikož arginin je v protaminu nejhojněji zastoupená aminokyselina.

Byla optimalizována metoda, která využívala 10 mM kyselinu fosforečnou jako základní elektrolyt. Do základního elektrolytu byly tlakem 5 kPa dávkovány dvě zóny, a to roztok heparinu (120 s) a poté roztok tetraargininu (3 s). Poté bylo na kapiláru vloženo napětí 30 kV po dobu 30 s a zóny migrovaly proti sobě, což způsobilo vznik komplexu heparin-tetraarginin. Vzniklé zóny byly mobilizovány skrz detektor ven z kapiláry. Zbylý tetraarginin se zaznamenával pomocí UV detektoru při 200 nm a koncentrace heparinu byla vyhodnocena na základě úbytku plochy píku. Do roztoků bylo také pro zlepšení citlivosti a opakovatelnosti přidáno známé množství roztoku heparinu a do základního elektrolytu hydroxyethylcelulosa. Za těchto podmínek bylo dosaženo LOD 1,1 µg/ml a LOQ 3,8 µg/ml.

Klíčová slova

Heparin, tetraarginin, afinitní elektroforéza, kapilární zónová elektroforéza.

Abstract

Heparin is a mixture of sulfonated polysaccharides which is negatively charged. Heparin is a substance which is important in organism and fundamentally affects its physiology. Main attribute of heparin is anticoagulation – it prevents the complete blood coagulation. This anticoagulant effect balances the hemocoagulation by influencing the coagulation pathway. In some cases a pharmacological application of heparin is needed so the heparin is administrated as a injection of physiological solution of sodium or calcium heparine salt. Monitoring of level of the heparin in blood is problematic – methods used today are based on the measurement of a time required for blood clot formation. The result evaluation is done by comparing a sample with reference solution. These methods are relatively imprecise, can not be used in „on-line“ setting and are highly influenced by general health condition of patient.

In this work some principles of affinity capillary electrophoresis were adapted from another work – heparin was determined indirectly by monitoring of decrease of the peak area of protamine. Protamine is medically used antidote of heparin because they create a stable complex together. In this work protamine was replaced by well defined tetraarginine because the most frequent amino acid in protamine is arginine.

The method was optimized – 10 mM phosphoric acid is used as background electrolyte. Two zones are hydrodynamically (5 kPa) injected into the capillary. First is heparine (120 s) and second tetraarginine (3 s). After injection 30 kV voltage is applied for 30 seconds – the zones migrate through each other so the complex is formed. Zones are then mobilized through detector out of capillary. The electropherogram of unattached tetraarginine is recorded spectrophotometrically (200 nm). The concentration of heparin in solution is calculated according to the decrease of the peak area of tetraarginine.

To improve sensitivity and run-to-run repeatability a known amount of heparin was added to calibration solutions and hydroxyethylcellulose was added to background electrolyte. Using these conditions LOD was calculated as 1,1 µg/ml and LOQ as 3,8 µg/ml.

Keywords

Heparin, tetraarginine, affinity electrophoresis, capillary zone electrophoresis.

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Tomáši Křížkovi za zajímavé téma práce, nápady, motivaci, odborné rady a jeho trpělivost. Také bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

Obsah

| | |
|--|----|
| Seznam zkratek | 7 |
| Seznam symbolů | 8 |
| 1 Cíl práce..... | 9 |
| 2 Teoretická část..... | 10 |
| 2.1 Heparin..... | 10 |
| 2.2 Nízkomolekulární hepariny | 14 |
| 2.3 Metody stanovení heparinu v krvi používané v klinické praxi..... | 14 |
| 2.4 Další metody stanovení heparinu v různých matricích..... | 18 |
| 2.4.1 Spektrofotometrické metody | 18 |
| 2.4.2 Elektrochemické metody | 19 |
| 2.4.3 Enzymové reakce..... | 19 |
| 2.4.4 Separační metody..... | 19 |
| 2.4.5 Kapilární elektroforéza | 21 |
| 2.5 Antidota heparinu | 23 |
| 3 Experimentální část..... | 25 |
| 3.1 Použité chemikálie | 25 |
| 3.2 Použité přístroje | 25 |
| 3.3 Obecné postupy a základní parametry metod | 26 |
| 4 Výsledky a diskuze | 27 |
| 4.1 Výběr základního elektrolytu..... | 27 |
| 4.2 Volba doby vkládání napětí..... | 29 |
| 4.3 Kalibrační závislosti v základním uspořádání | 32 |
| 4.4 Změna experimentálního uspořádání..... | 36 |
| 4.5 Volba délky dávkované zóny heparinu..... | 38 |
| 4.6 Metoda se standardním přídatkem..... | 40 |
| 4.7 Dávkování tetraargininu..... | 42 |
| 4.8 Přídavek hydroxyethylcelulosity do základního elektrolytu | 43 |
| 4.9 Určení pracovních charakteristik metody..... | 48 |
| 4.10 Stabilita tetraargininu..... | 51 |
| 4.11 Možnost zkrácení doby analýzy | 54 |
| 5 Závěr | 58 |
| 6 Literatura | 60 |

Seznam zkratek

| | |
|--------------|--|
| ACT | aktivovaný koagulační čas |
| aPTT | aktivovaný parciální tromboplastinový test |
| BGE | základní elektrolyt |
| C18 | oktadecyl |
| CAS | registrační číslo chemikálie |
| CE | kapilární elektroforéza |
| CTAB | cetyltrimethylamoniumbromid |
| DAD | detektor s diodovým polem |
| EDTA | kyselina ethylendiamintetraoctová |
| ELISA | enzymový imunotest |
| HEC | hydroxyethylcelulosa |
| HILIC | hydrofilní interakční chromatografie |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| INR | mezinárodní normalizovaný poměr |
| LMWH | nízkomolekulární heparin |
| LOD | mez detekce |
| LOQ | mez kvantifikace |
| PT | protrombinový čas |
| RSD | relativní směrodatná odchylka |
| SEC | vylučovací chromatografie |
| SD | směrodatná odchylka |
| TA | tetraarginin |
| TT | trombinový čas |
| UFH | nefrakcionovaný heparin |
| UV/VIS | ultrafialová/viditelná oblast |

Seznam symbolů

| | | |
|-------------|-------|--|
| k | | směrnice přímky |
| l_D | | efektivní délka kapiláry |
| l_c | | celková délka kapiláry |
| q | | úsek přímky |
| r | | vnitřní průměr kapiláry |
| R^2 | | koefficient determinace |
| $s_{x,y}$ | | rozptyl dat okolo přímky |
| t | | čas |
| t_{mig} | | migrační čas |
| t_U | | doba vkládání napětí |
| t_{EOF} | | migrační čas markeru elektroosmotického toku |
| U | | napětí |
| v_{TA} | | rychlost migrace tetraargininu kapilárou |
| x | | nezávisle proměnná |
| y | | závisle proměnná |
| μ_{EOF} | | elektroosmotická mobilita |
| μ_{ef} | | efektivní mobilita |
| μ_{poz} | | pozorovaná mobilita |

1 Cíl práce

Cílem této práce je využít interakci mezi tetraargininem a heparinem k vývoji metody pro stanovení heparinu a publikované poznatky o interakcích heparinu využít pro definování optimálních podmínek elektroforetické separace. Cílem je sledovat vliv změny parametrů metody na výsledné elektroferogramy a kalibrační závislosti, přičemž těmito parametry jsou myšleny základní elektrolyt, elektrické pole, experimentální uspořádání a případně elektroosmotický tok v kapiláře.

2 Teoretická část

2.1 Heparin

2.1.1 Historie

Heparin patří k nejstarším lékům, které jsou stále používány v klinické praxi¹⁻⁵. Za jeho hlavní objevitele jsou považováni William Henry Howell a Jay McLean, ovšem na výzkumu se podílela i řada dalších vědců. Za počátek výzkumu heparinu se považuje rok 1916, kdy McLean jakožto student druhého ročníku medicíny pracoval pod vedením profesora Howella na výzkumu v laboratořích Johns Hopkins University v Baltimoru. Předmětem Howellova výzkumu byly obecně látky, jež ovlivňují srážlivost krve. McLean zde dostal za úkol potvrdit Howellovu teorii a tento úkol velmi brzy splnil – začal tedy pracovat na vlastním výzkumu. Ze zvířecích jater extrahoval fosfatidy, které ovlivňují srážlivost krve.

V roce 1918 se v laboratoři profesora Howella podařilo izolovat heparin – byl pojmenován podle řeckého „hepar“ (játra), protože byl izolován z buněk psích jater. Profesor Howell představil heparin odborné veřejnosti a brzy po roce 1926 začala heparin vyrábět farmaceutická společnost ve větším množství. Pro eliminaci vedlejších účinků probíhaly současně na několika pracovištích výzkumy na přečišťování heparinu, ale již bez Howella. V roce 1933 Kanadčan Charles Best shrnul dosavadní práci vědců, popsal podrobně výskyt a extrakci heparinu a vyvrátil jedno z původních Howellových přesvědčení o vlivu heparinu na viskozitu krve. Roku 1937 byla u člověka poprvé použita čistší forma heparinu bez vedlejších účinků a lékaři předpověděli využívání heparinu pro léčbu ve velkém měřítku.

Po více jak dvaceti letech od počátku, v roce 1939, se do problematiky heparinu opět zapojil Jay McLean. Tentokrát se zaměřil na klinický účinek heparinu u pacientů s gangrénou končetin. Výzkum byl úspěšný a pomohl odvrátit řadu amputací. V roce 1960 byla provedena první randomizovaná klinická studie heparinu⁶ a od té doby je heparin stále používán až dodnes.

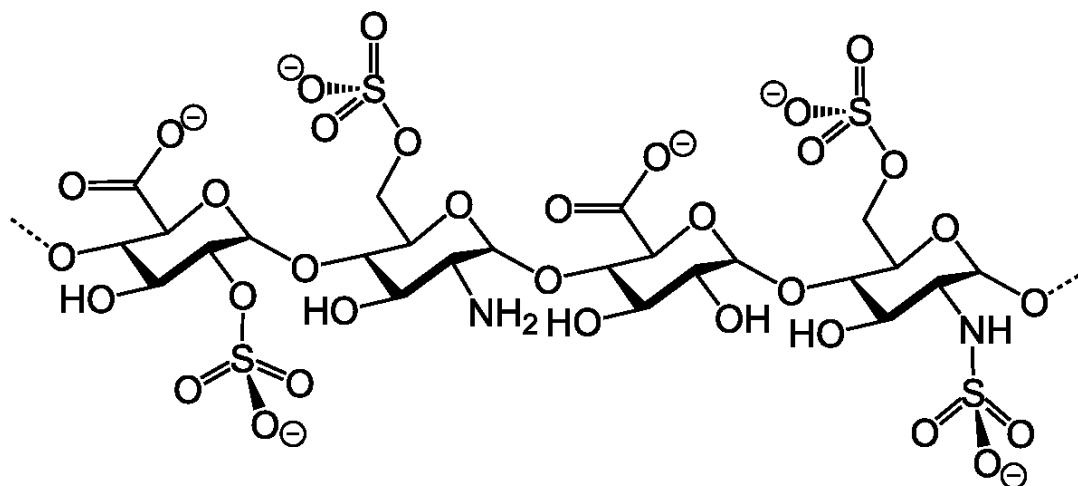
Zásluhy na objevu a výzkumu heparinu byly původně přisuzovány pouze profesorovi Howellovi. Jay McLean ale začal boj o uznání svého podílu. I přes negativní

postoje kolegů se nakonec dokázal prosadit. Po své smrti v roce 1959 byl v nekrologu označen jako objevitel heparinu (Howell zde nebyl vůbec zmíněn) a v roce 1963 byla na Johns Hopkins University odhalena pamětní deska na památku objevu heparinu v roce 1916 Williamem Henry Howellem a Jay McLeanem.

2.1.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti a struktura

Heparin ve formě sodné nebo vápenaté sole je bílý prášek bez zápachu, jde o látku mírně hygroskopickou a dobře rozpustnou ve vodě⁷. Heparin se také označuje jako UFH, což je zkratka anglického „unfractionated heparin“ – nefrakcionovaný heparin.

Heparin se řadí do skupiny glykosaminglykanů (také nazývaných mukopolysacharidy)⁷⁻¹⁰. Jde o heterogenní směs lineárních i rozvětvených polysacharidů o molekulové hmotnosti 3000 – 30 000 g/mol. Řetězec je tvořen střídáním glukosaminů a hexuronových kyselin (epimery kyselina glukuronová a kyselina iduronová). Na tyto základní podjednotky jsou navázány sulfátové a karboxylové skupiny, molekula tedy celkově nese negativní náboj (viz obr. 1) a je považována za biologickou makromolekulu s největším negativním nábojem.



Obr. 1: *Struktura základní podjednotky heparinu.*

2.1.3 Výskyt a fyziologický význam heparinu v těle

Z hlediska fyziologie a medicíny patří heparin k velmi významným a zároveň složitým látkám – vyskytuje se přirozeně v organismech, a to nejvíce v žírných buňkách^{11,12}. Žírné buňky (neboli mastocyty) se vyskytují v různých tkáních, jako například ve vazivové tkáni nebo v blízkosti nervových zakončení, ovšem nejhojněji jsou hlouběji v kůži a ve stěně gastrointestinálního traktu. Mají zde podobnou funkci jako bazofilní granulocyt v krvi, tzn. že obsahují zrnité váčky, které mohou za určitých okolností uvolňovat látky do svého bezprostředního okolí. Hlavní látkou obsaženou v žírných buňkách je histamin, jehož uvolnění do okolí způsobuje alergickou reakci. Druhou látkou obsaženou ve váčcích žírných buněk je právě heparin.

Primární funkce heparinu v těle je působení proti srážení krve. V souvislosti s tím, že se z váček žírných buněk uvolňuje současně s histaminem, je předpokládáno, že jeho fyziologická funkce je zabránit srážení krve při zpomalení proudění krve při histaminové vazodilataci¹².

Heparin pro terapeutické využití se extrahuje z hovězích a vepřových sliznic střev a plic, následně je směs purifikována do krystalické formy a zpracována rozpuštěním ve fyziologickém roztoku na komerčně dostupné farmaceutické přípravky^{7,8}.

2.1.4 Indikace, kontraindikace a farmakokinetika heparinu

Heparin se podává za antikoagulačním účelem^{8,9,13,14}. Obecně lze říct, že se heparin podává tam, kde je srážení krve nežádoucí a kde je vyžadován rychlý, krátkodobý účinek. Například při akutní hluboké žilní trombóze, akutním infarktu myokardu, plicní embolii, nestabilní angině pectoris nebo během dialýzy a ostatních zákroků s mimotělním krevním oběhem (umělé materiály přístrojů aktivují srážení krve).

Kontraindikace představují stavy s vysokým rizikem závažného krvácení, nekontrolovaná hypertenze, hemoragická diatéza (hemofilie, těžká trombocytopenie), heparinem indukovaná trombocytopenie, stavy se zvýšenou pravděpodobností krvácení, a podobně.

Heparin se podává pouze intravenózně (působí ihned) nebo subkutánně (působí asi po dvou hodinách) buď jednorázově nebo lineárním dávkovačem kontinuálně. Svůj

antikoagulační účinek heparin vykazuje relativně krátkou dobu, biologický poločas je (v závislosti na dávce) 1 až 2 hodiny. Tohoto se využívá právě při akutních situacích, kdy lékař potřebuje zastavit srážení krve, ale je nežádoucí dlouhodobý účinek. Příkladem je právě akutní infarkt myokardu, kdy není dopředu jasné, zdali pacient bude muset podstoupit kardiochirurgický zákrok – pokud by se pacientovi aplikoval přípravek s delší dobou účinku (nízkomolekulární heparin, nemá protilátku k předčasnému potlačení účinku), mohlo by to vést k riziku vykrvácení pacienta během zákroku. Stejná situace je při jakémkoliv tepenném uzávěru, obvykle na dolních končetinách.

2.1.5 Mechanismus působení heparinu

Heparin zasahuje do složitého biochemického procesu zvaného koagulační kaskáda^{8,9,12-14}. Tento jev je souborem dějů vedoucích k hemokoagulaci (srážení krve) a posléze k hemostáze (zástavě krvácení). Základem je vytvoření fibrinové sítě, která zachycuje buňky z cév a společně tvoří trombus. Koagulační kaskáda se dělí do několika fází:

- tvorba aktivátoru protrombinu,
- přeměna protrombinu na trombin,
- přeměna fibrinogenu na fibrin.

Hemokoagulace ale musí být neustále fyziologicky vyrovnávána antikoagulačními ději (protisrážlivé mechanismy). Oba tyto děje musí být v rovnováze (fluido-koagulační rovnováha), převaha jednoho z nich může mít fatální následky.

Hlavním antikoagulačním faktorem je antitrombin III. Ten inaktivuje trombin a koagulační faktory IX, X, XI a XII tak, že s danými látkami tvoří komplexy a ireverzibilně blokuje jejich aktivní centrum. Trombin v koagulační kaskádě aktivuje několik faktorů, ale hlavně mění fibrinogen na jeho aktivní monomerní formu, která polymeruje za vzniku fibrinu. Inaktivace trombinu vede ke zpomalení tohoto dílčího děje, tedy k blokádě celého procesu srážení krve. Heparin zde figuruje jako přirozený kofaktor právě pro antitrombin III – váže se na pozitivně nabitě lysinové skupiny antitrombinu III a tvorbu komplexu antitrombinu III s trombinem více než tisícinásobně urychluje. Pro inaktivaci koagulačního faktoru Xa stačí pouhé navázání heparinu na antitrombin III, pro inaktivaci dalších faktorů (i trombinu) se heparin musí navázat jak na molekulu

antitrombinu III, tak na koagulační faktor.

2.2 Nízkomolekulární hepariny

Nízkomolekulární hepariny jsou také označovány jako LMWHs – z anglického „low molecular weight heparins“ – česky nízkomolekulární hepariny, případně frakcionované hepariny^{8,9,13,14}. Takto se označuje skupina několika antikoagulačních léčiv, která se mezi sebou z hlediska struktury liší především molekulovou hmotností. Vyrábí se enzymovým či chemickým štěpením nefrakcionovaného heparinu, ovšem kvůli rozdílům ve výrobních postupech jednotlivých firem nelze jednotlivé komerčně dostupné přípravky libovolně zaměňovat (nemají vždy stejné účinky kvůli odlišnostem ve struktuře).

Molekulová hmotnost nízkomolekulárních heparinů se pohybuje v rozmezí od 4 000 do 6 000 g/mol. V molekule nízkomolekulárního heparinu obvykle chybí 18 sacharidových jednotek vedle pentasacharidového vazebného místa pro antitrombin. Absence dlouhého sacharidového řetězce způsobuje, že je inhibován převážně jen faktor Xa. To v důsledku vede k paradoxu, že při použití LMWH nedochází k výraznému prodloužení laboratorních testů aPTT nebo TT – tyto testy jsou tedy pro monitoring LMWH nepoužitelné, lze využít pouze anti-Xa test (kapitola 2.3.4).

LMWH se využívá k dlouhodobé léčbě, kdy si přípravek pacient sám aplikuje subkutánně jednou denně. Výhodou je dlouhodobé působení – 12 až 24 hodin. Nízkomolekulární hepariny mají také tu výhodu, že je výrazně těžší se jimi předávkovat než standardním heparinem – není tedy nutný tak pečlivý monitoring (ovšem existuje ta nevýhoda, že při předávkování není dostupné spolehlivé antidotum – protamin působí pouze částečně).

2.3 Metody stanovení heparinu v krvi používané v klinické praxi

V praxi se vzorky krve odebírají do zkumavek s antikoagulačním činidlem v závislosti na tom, jaký analyt bude ve vzorku stanovován. V případě heparinu se jako antikoagulační činidla používají zkumavky s EDTA nebo citrátem sodným, tak vzniká tzv. dekalifikovaná plasma. Vzorky jsou v laboratoři neprodleně centrifugovány a tím je oddělena plasma od frakce krvinek. K dalšímu zpracování se používá plasma, není-li

uvedeno jinak.

Při metodách využívaných v klinické praxi se měří čas potřebný ke vzniku sraženiny ve vzorku pomocí spektrofotometrie – krev se vnese do přístroje, který má v připravených kyvetách potřebná činidla – těmi se spustí koagulace krve a roztok se rozpohybuje v pokusném kanálku tam a zpět. Při vzniku krevní sraženiny se pohyb zpomalí, toto zaregistrují optické senzory a vyhodnotí konec testu¹⁵. Další způsob detekce vzniku sraženiny je mechanický – do zkumavek s potřebnými činidly se přenese krev, zkumavky se vloží do přístroje, kde se otáčí – v těchto zkumavkách je malý magnet, který se také otáčí – při vzniku sraženiny začne klást odpor nebo se zcela zastaví, a to zaregistruje druhý magnet v přístroji, který signál vyhodnotí, přepočítá na čas a vyhodnotí konec testu¹⁶. Nejstarší metodou je protahování malého kovového háčku vzorkem s koagulačními činidly a pozorování zachycení prvního vlákna krevní sraženiny¹⁷, případně porovnání vzniku sraženiny ve vzorku vzhledem ke standardnímu roztoku pouhým okem. U všech metod se vždy vzorky porovnávají se standardními roztoky o známé koncentraci.

2.3.1 Aktivovaný parciální tromboplastinový test – aPTT

Tento test sleduje obecně účinnost vnitřního koagulačního systému a společné cesty¹⁸⁻²¹. Je to dosud nejrozšířenější test pro stanovení hladiny heparinu v krvi. Pro test jsou vyráběny tzv. sety (sada reagensů a standardů připravená k okamžitému použití). Principem aPTT je aktivovat vnitřní cestu hemokoagulace. Vzorek je inkubován při 37 °C a jsou postupně přidány kaolin-kefalinový komplex a přebytek vápenatých iontů. Kaolin je zde jako záporně nabitý povrch, aby aktivoval vnitřní koagulační cestu a kefalin funguje jako aktivátor faktoru X. Přebytek vápenatých iontů posléze odstartuje společnou cestu srážení. Celý postup se několikrát opakuje pro statistické vyhodnocení a dále se porovnává s kontrolní plasmou (kontrola funkčnosti komplexů). Fyziologické hodnoty se pohybují okolo 25 až 35 s.

Test mohou ovlivnit hemofilie, vrozené choroby, celkový zdravotní stav pacienta, přítomnost nežádoucích protilátek, velmi drobné odchylky od postupu i rozdíl v jednotlivých šaržích nebo výrobcích reagensů.

2.3.2 Aktivovaný koagulační test – ACT

Tato metoda se využívá pouze tam, kde jsou předpokládány vysoké koncentrace heparinu v krvi – u pacientů podstupujících kardiochirurgické operace (mimotělní oběh krve), na jednotkách intenzivní péče nebo u pacientů po koronárních angioplastikách a při dialýze¹⁸⁻²¹. V těchto případech je test aPTT neúčinný, jelikož přílišná koncentrace heparinu zcela znemožní sražení krve a tím pádem vyhodnocení aPTT. Metoda ACT je principem podobná aPTT – měří se čas vzniku sraženiny od aktivace koagulace vhodnou kontaktní látkou (např. kaolin) v porovnání se standardními roztoky. Nepřidávají se ani fosfolipidy, ani vápenaté ionty a test probíhá přímo s plnou krví, nikoliv s plasmou. Pro jednoduché provedení se tato metoda může provádět přímo na operačním sále. Hodnoty pro normální krev se pohybují okolo 150 s, při heparinizaci pro mimotělní oběh a hemodialýzu 180 až 300 s, během kardiochirurgického zákroku jde o více než 600 s.

2.3.3 Quickův test/protrombinový čas – PT/tromboplastinový čas – TT

Test ukazuje rychlost přeměny protrombinu na trombin působením tkáňového tromboplastinu¹⁷⁻¹⁹. Do dekalifikované plasmy se přidá tkáňový tromboplastin a přebytek vápenatých iontů – tak se aktivuje vnější a společná cesta koagulace a měří se čas do vzniku sraženiny. Získané výsledky se přepočítávají na INR – international normalized ratio (mezinárodní normalizovaný poměr), protože komerčně dodávané tkáňové tromboplastiny se mezi sebou liší a takto se do výsledku zahrne jejich účinnost. Fyziologické hodnoty se pohybují mezi 12 a 15 s, při používání heparinu je čas prodloužen – primárně ale metoda neslouží jen ke stanovení hladiny heparinu v krvi, ale k určení funkčnosti celého koagulačního systému.

2.3.4 Anti Xa-test

V ojedinělých případech lze pro monitoring nefrakcionovaného heparinu použít i test anti-Xa, který se běžně používá pro sledování hladiny nízkomolekulárního heparinu¹⁸⁻²⁰. Jde o případy pacientů se sníženou reakcí na heparin nebo s mnoha interferenčními faktory, které by mohly aPTT ovlivnit. Přípravou standardů o známé

koncentraci se zkonstruuje kalibrační závislost – k plasmě se přidá známé množství heparinu a poté faktor Xa – vytvoří se komplex antitrombin III-faktor Xa a je sledován přebytek faktoru Xa.

Tento přebytek je možné stanovit metodou měření času tvorby sraženiny, podobně jako v aPTT testu. Převážně se ale využívá spektrofotometrická metoda, kdy je ke kalibračním roztokům přidán specifický chromogenní substrát. Tato metoda se provádí buď v kinetickém provedení (měření změny absorbance za čas) nebo kalibračním provedení (reakce se zastaví přidáním činidla a změří se absorbance).

2.3.5 ELISA

Další významnou metodou pro stanovení heparinu je metoda zvaná „enzyme-linked immuno sorbent assay“ (zkráceně ELISA). Jde o metodu, která se obecně v klinických laboratořích využívá velmi hojně, avšak ne pro stanovení heparinu. Důvodem je v tomto případě zejména zdoluhavé provedení (řádově desítky minut) a především cena (cena ELISA setu pro stanovení heparinu se pohybuje od 450 do 700 euro)²². Proto není metoda ELISA pro stanovení heparinu v klinické praxi rutinně používána a setkat se s ní lze spíše ve výzkumu (viz kapitola 2.4.3).

2.3.6 Výhody a nevýhody prakticky využívaných metod

Výhodou metod je jejich specifčnost – v tak složité matici, jako je krev nebo krevní plasma, je složité zbavit se interferencí ostatních látek. Další výhodou je jejich instrumentální nenáročnost – používat v klinické praxi analyzátory je možné, ale není to bezpodmínečně nutné. Nevýhodou je jejich nesnadná interpretace, nízká robustnost, vysoký vliv ostatních faktorů v krvi – okamžitý celkový stav pacienta ovlivňuje koagulační kaskádu, nemožnost „on-line“ sledování, časová náročnost metod (jelikož měřeným parametrem je čas, nelze metodu zrychlovat), mnoho specifických činidel potřebných k provedení.

2.4 Další metody stanovení heparinu v různých matricích

2.4.1 Spektrofotometrické metody

Pro stanovení heparinu ať už v plasmě nebo farmaceutických přípravcích bylo popsáno několik spektrofotometrických metod. Při metodách není sledován přímo heparin, ale změna absorbance nebo fluorescence roztoku s pomocným činidlem, případně změna koncentrace pozitivně nabitých barviv – metody vždy využívají nepřímé sledování koncentrace heparinu.

Bylo popsáno, že v přítomnosti některých bazických fenothiazinových barviv, jako je methylenová modř, Azur B nebo toluidinová modř může heparin utvořit takové komplexy, které vykazují výrazný nárůst rezonančního Rayleighova rozptylu a vznik nových píků ve spektru. Na základě těchto poznatků byla popsána metoda pro stanovení heparinu ve injekčním roztoku²³. Podobný efekt byl zaznamenán i při použití kladně nabitě komplexní sloučeniny kobaltnatých iontů a 4-[(5-chloro-2-pyridyl)azo]-1,3-diaminobenzenu²⁴.

Na výzkum interakcí heparinu s fenothiazinovými barvivami navazuje jedna z metod, kde je využita průtoková injekční analýza – v reakční cívce je tvořen komplex mezi heparinem a barvivem Azur B a měří se rezonanční rozptyl světla – signál je pak přímo úměrný koncentraci heparinu²⁵. Podobně mohou glykosaminglykany tvořit vazby s fenosafraninem²⁶.

Klasickou spektrofotometrickou metodou byl sledován pokles absorbance roztoku neutrální červeně v přítomnosti heparinu²⁷, stejně tak jako u roztoku brilantní kresylové modři²⁸. Zlaté nanočástice funkcionalizované cetyltrimethylamoniumbromidem (CTAB) vykazují v přítomnosti heparinu naopak výrazný nárůst absorbance²⁹.

Tetracyklin-europitý komplex a norfloxacin-ceritý komplex jsou fluorescenční činidla, jejichž fluorescence se zvyšuje s rostoucí koncentrací heparinu v roztoku – tyto metody byly použity pro stanovení heparinu v injekčních roztocích³⁰, případně i v plasmě nebo plné krvi³¹.

Další technikou je využití protaminu vázaného na fluorescein-isothiokyanát – vazba mezi takto značeným protaminem a heparinem vedla ke značnému zhášení fluorescence – metoda byla použita pro měření hladiny heparinu v hovězí plasmě³².

Byly publikovány práce popisující vysoce selektivní senzory fungující na základě fluorescence^{33,34}.

2.4.2 Elektrochemické metody

Z elektrochemických metod lze zmínit konduktometrickou detekci jako zakončení separačních metod^{35,36}, dále cyklickou voltametrii na zlaté elektrodě založenou na interakci heparinu s methylenovou modří³⁷. Popsána byla i voltametrie se rtuťovou kapkovou elektrodou s použitím malachitové zeleně³⁸. Dále byly využívány potenciometrické metody – titrace protaminem na rozhraní polykationově selektivní membránové elektrody³⁹, a to i v uspořádání průtokové analýzy⁴⁰.

Tyto i další elektrochemické metody nalézají uplatnění v oblasti senzorů^{41,42}. Propojením elektrochemických metod s klinickou praxí je použití piezoelektrického krystalu k vyhodnocení při metodách aPTT nebo ACT – senzor s piezoelektrickým krystalem reaguje na změnu viskozity vzorku krve při srážení krve⁴³.

2.4.3 Enzymové reakce

Již zmíněná ELISA využívá sendvičového principu^{20,22}. Antigen specifický pro heparin je ukotven v jamkách. Na antigen se váže heparin ze vzorků a do jamek je poté přidán konjugát protilátky heparinu s křenovou peroxidázou (následuje inkubace při 37 °C po dobu 30 min a třepání). Po čtyřnásobném promytí a reakci s tetrametylbendidem (4 – 30 min ve tmě) se roztoky okyselí stop činidlem a deteguje se žluté zbarvení při 450 nm.

2.4.4 Separační metody

Heparin je možné stanovovat i pomocí chromatografických metod, ty využívají modifikace nebo kombinace výše zmíněných metod jako detekci. Chromatografická separace zde pomáhá k rozdělení analytů, případně oddělení matrice v reálných vzorcích.

Metoda kapalinové chromatografie pro zkoušky heparinu je popsána v Českém lékopise, kde slouží jako jedna ze zkoušek totožnosti heparinu a jako metoda pro zkoušení

přítomnosti příbuzných látek⁷. Používá se předkolona (50 × 2 mm) se stacionární fází anex R (iontoměnič – kvartérní amoniové sole navázané na polystyren zesíťovaný divinylbenzenem, 13 μm); kolona (250 × 2 mm) také se stacionární fází anex R (9 μm). Mobilní fáze se skládá ze dvou složek a je předepsán čtyřicetiminutový gradientový program. První složka je 0,04% roztok dihydrogenfosforečnanu sodného s úpravou pH kyselinou fosforečnou na 3,0; druhá složka je stejný roztok, ale s přídavkem chloristanu sodného. Separace probíhá při 40 °C a průtoku 0,22 ml/min se spektrofotometrickou detekcí při 202 nm. Retenční čas heparinu je přibližně 26 minut a výsledky lékopisných zkoušek se vyhodnocují na základě porovnání chromatogramů vzorku a předepsaných porovnávacích roztoků.

Pro stanovení heparinu v plasmě byla vyvinuta HPLC metoda, kde byla použita kolona HPX-87H s polární stacionární fází (300 × 7,8 mm; 9 μm), mobilní fáze 5,0mM kyselina sírová s průtokem 0,5 ml/min při isokratické eluci⁴⁴. Detekce probíhala na základě měření rezonančního rozptylu světla, který umožňuje vznikající komplex heparin-CTAB (komplex vznikal po přidání CTAB v reakční cívce za kolonou). Metoda byla použita pro stanovení heparinu v reálných vzorcích plasmy pacientů podstupujících dialýzu.

Další metoda, kterou byl stanoven heparin pouze ve farmaceutických přípravcích, je vylučovací chromatografie⁴⁵. Byla použita kolona BioSep-SEC-S 2000 (300 × 7,8 mm) s roztokem L-argininu o pH 6,5 jako mobilní fází. Detekce probíhala spektrofotometricky při 210 nm. Největší výhodou metody je její jednoduchost, ovšem není použitelná pro vzorky krevní plasmy.

Metoda, která byla popsána pro charakterizaci heparinu a jeho nízkomolekulárních fragmentů, je založena na principu rozkladu a derivatizace heparinové struktury⁴⁶. Molekula heparinu se nejprve enzymaticky depolymerizovala na disacharidy, které se derivatizovaly 2-aminoakridonem. Složky vzorků byly separovány na koloně Discovery-C18 (250 × 4,6 mm; 5 μm). Jako mobilní fáze byla v gradientovém programu používána směs methanolu a 60 mM octanu amonného (pH = 5,6). Detekce a charakterizace analytů byla zajištěna kombinací fluorescenční spektrometrie a hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací. Tato metoda je použitelná pro vzorky v krevní plasmě.

Příkladem dalšího využití enzymatického rozkladu je jiná metoda – heparin byl

depolymerizován kombinací lyáz na disacharidy⁴⁷. Tyto byly separovány v koloně TSKgel Amide-80 (specifická HILIC stacionární fáze) v isokratickém režimu během 25 minut ve směsi acetonitrilu, vody, 0,2M fosfátového pufru a 3,0M chloridu amonného. Detekce byla provedena fluorescenční spektrofotometrií s použitím derivatizačního činidla (přidáno po separaci) 2-kyanoacetamidu. Metoda byla použita pro stanovení heparinu v lidské moči.

2.4.5 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza umožňuje provádět analýzy s minimální spotřebou vzorku – to je v případě analýzy biologických vzorků důležitá vlastnost. Byly publikovány práce popisující metody pro stanovení heparinu v krvi, v injekčních roztocích, případně pro sledování interakcí heparinu nebo pro sledování čistoty vyráběného heparinu.

Pomocí kapilární elektroforézy byly ze vzorku separovány kyselina hyaluronová, chondroitin sulfát, dermatan sulfát a heparin – jako základní elektrolyt byl využit diethylentriamin (pH = 5,0) a byly sledovány faktory ovlivňující migraci těchto analytů⁴⁸. Chondroitin sulfát je významná nečistota při výrobě heparinu, proto byla vyvinuta metoda s 600 mM fosfátovým pufrem (pH = 3,5) jako základním elektrolytem⁴⁹ – heparin byl v obou případech v křemenné kapiláře separován od nečistot a detegován přímo spektrofotometricky. V 50 mM fosfátovém pufru (pH = 3,5), křemenné kapiláře s UV detekcí byla sledována čistota heparinu a jeho interakce s hovějším sérovým albuminem a fibroblastovým růstovým faktorem⁵⁰.

Další dvě metody využívají konduktometrickou detekci. Konduktometrická detekce se vyznačuje tím, že jde použít k přímé detekci, bez derivatizace nebo podobné úpravy stanovovaného heparinu, který neabsorbuje UV/VIS záření tak, aby šlo spolehlivě použít přímou spektrofotometrickou detekci. Také při tomto způsobu detekce neinterferují chromofory nebo kovové ionty³⁵. První metoda je založena na separaci v kapiláře z fluorovaného kopolymeru ethylenu s propylenem o vnitřním průměru 300 μm s. Jako základní elektrolyt byl použit glycinový pufr o koncentraci 25 mM a pH 9,0. Do základního elektrolytu byly pro zvýšení separační selektivity přidávány polyvinylpyrrolidon nebo dextran a separace probíhala v režimu konstantního proudu 70 μA . Tato metoda byla aplikována ve formě stanovení obsahu heparinu ve vodných

roztocích i ve fyziologickém roztoku³⁵. Mez detekce této metody byla vypočítána jako 40 µg/ml, mez kvantifikace 133 µg/ml, přičemž lineární dynamický rozsah metody byl 100 až 500 µg/ml.

Podobná metoda použitá na vzorky injekčních roztoků a krevní plasmy využívala také konduktometrický detektor a přídavek hydroxyethylcelulosity, polyethylenglykolu nebo dextransu do základního elektrolytu, 0,8 M kyseliny octové o pH 2,3³⁶. Mez detekce optimalizované metody byla stanovena na 16 µg/ml v modelovém vzorku, na 100 µg/ml ve vzorku plasmy, přičemž lineární rozsah byl 25 až 1000 µg/ml, respektive 200 až 500 µg/ml. Přidávání polymerních roztoků do základního elektrolytu, jak je použito v těchto dvou metodách, slouží k ovlivnění elektroosmotického toku. Polymery pokrývají velmi tenkou vrstvou stěny kapiláry a zasahují do tvorby elektroosmotického toku. Tyto polymery téměř nemají vliv na migraci anorganických iontů interferujících z pufrů nebo fyziologických roztoků, ovšem velmi snižují migraci samotného heparinu a jeho komplexů. Tím je umožněna lepší separace daných zón a zvýšena selektivita metody.

V neposlední řadě je třeba zmínit metodu, která byla vyvinuta ke sledování chování a stanovení heparinu – jde o metodu afinitní kapilární elektroforézy, kde se využívá interakce heparinu s protaminem⁵¹. Při této metodě bylo sledováno chování vznikajícího komplexu heparin-protamin a zkoušeny různé způsoby experimentálního provedení (mísení předem ve vialce, přímo v kapiláře nebo využití krátkých zón). Poté byl sledován úbytek píku protaminu nebo tetraargininu v závislosti na koncentraci heparinu v roztoku. Jako základní elektrolyt byla používána kyselina fosforečná o koncentracích 20 a 60 mM, do kapiláry byly dávkovány zóny protaminu a heparinu a po vložení napětí byl vzniklý komplex mobilizován skrz detektor. Mez detekce optimalizované metody byla 1,9 µg/ml a mez kvantifikace 6,3 µg/ml heparinu v 20 mM kyselině fosforečné, v 60 mM kyselině fosforečné byla mez detekce 0,9 µg/ml a kvantifikace 2,9 µg/ml. Na základě této práce byly nastaveny některé výchozí parametry metody v této práci – například základní princip nepřímé detekce, kdy je heparin sledován na základě úbytku píku proteinu, který s ním tvoří stabilní komplex.

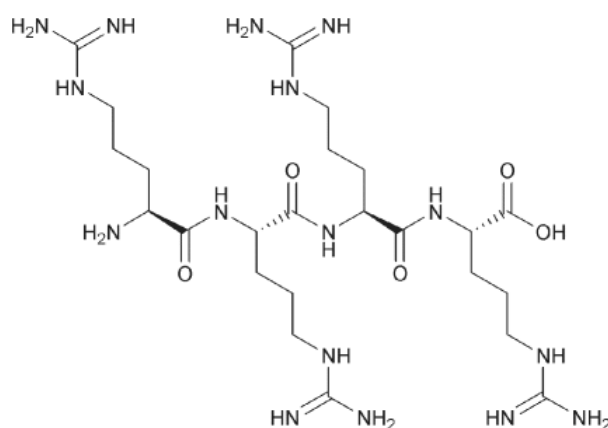
2.5 Antidota heparinu

2.5.1 Protamin

Protamin je nízkomolekulární protein (molekulová hmotnost okolo 4500 g/mol) – využívá se intravenózně jako specifické antidotum heparinu, které velmi rychle (do 5 minut) a účinně ruší působení heparinu v krvi^{8,12,14,52,53}. Protamin je k dispozici ve formě sulfátu, případně chloridu a podává se pacientům po operaci nebo při nežádoucím předávkování heparinem. Na nízkomolekulární hepariny působí také, ale v menší míře. Sám může ve velkých dávkách vykazovat slabé antikoagulační účinky. Klíčem k zastavení funkce heparinu je to, že protaminsulfát je kladně nabitý protein a se záporně nabitým heparinem tvoří komplex, který je v koagulační kaskádě neaktivní. Dávka nutná k vyvážení 1 mg heparinu (100 IU) je 1 – 1,5 mg protaminsulfátu. Vznikající komplex heparin-protamin může být po čase částečně metabolizován a heparin opět uvolněn do krve, je tedy nutné po čase opět zkontrolovat hladinu heparinu v krvi.

2.5.2 Tetraarginin

Tetraarginin je v této práci použit jako zástupce protaminu. Protamin se skládá z alaninu, isoleucinu, prolinu, serinu, valinu a glycinu, a není zcela přesně definován, avšak z 60–80 % obsahuje arginin⁵³. Uvádí se, že komplex protamin-heparin je tvořen



Obr. 2: Struktura tetraargininu.

vazbou mezi sulfátovými a karboxylovými skupinami heparinu a guanidinovými skupinami argininu⁵⁴ – proto byl pro sledování interakcí a vývoj metody zvolen právě tetraarginin. Struktura tetraargininu je znázorněna na obr. 2.

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

- Pro přípravu zásobního roztoku heparinu v kyselině fosforečné byla použita sodná sůl heparinu z mukózy vepřových střev čistoty I-A (dodavatel Sigma-Aldrich, USA; CAS 9041-08-1). Skladováno při 5 °C.
- Zásobní roztok tetraargininu ve vodě byl připraven z trifluoroacetátu tetraargininu (dodavatel Bachem AG, Švýcarsko; CAS 26791-46-8). Skladováno při -18 °C.
- Základní elektrolyt byl připraven ředěním 85% kyseliny fosforečné čistoty p. a. (dodavatel Lach-Ner, ČR; CAS 7664-38-2). Skladováno při 5 °C.
- Roztok hydroxyethylcelulosity byl připraven rozpuštěním pevné hydroxyethylcelulosity ve vodě (dodavatel Ashland, USA) ve vodě. Skladováno při 5 °C.
- Kyselina chloroctová pro přípravu základního elektrolytu byla použita ACS čistoty (dodavatel Sigma-Aldrich, USA; CAS 79-11-8). Skladováno při 5 °C.
- K veškerým experimentům byla používána deionizovaná voda připravená systémem Milli-Q (Millipore, Bedford, USA).

3.2 Použité přístroje

- Veškerá měření byla provedena na přístroji Agilent 1600 CE s DAD detektorem (Agilent Technologies, USA).
- Separace probíhala v křemenné kapiláře (Polymicro Technologies, USA) pokryté polyimidem s vnitřním průměrem 50 μm a vnějším průměrem 375 μm. Celková délka kapiláry činila 50,0 cm, efektivní délka kapiláry byla 41,5 cm (pokud není uvedeno jinak).
- Naměřená data byla zaznamenána a zpracována v programu Agilent OpenLAB ChemStation (Agilent, USA).

3.3 Obecné postupy a základní parametry metod

Kapilára byla připravena opálením polyamidového povrchu na obou koncích a v detekční oblasti. Vždy před sérií měření byla kapilára promyta 1M roztokem hydroxidu sodného po dobu 15 minut a poté vodou po dobu 15 minut tlakem 95 kPa. Po skončení série měření byla kapilára stejným způsobem promyta vodou a skladována s konci uloženými ve vodě.

Dávkování zón bylo prováděno vždy hydrodynamicky, a to tlakem 5 kPa. Stejně probíhala mobilizace zón skrz kapiláru a přes detektor. Na kapiláru bylo aplikováno napětí 30 kV (pokud není uvedeno jinak) po dobu 30 s (pokud není uvedeno jinak) a vznikající proud činil přibližně 35 μ A. Teplota celého systému byla udržována na 25 °C. Záznam elektroferogramů byl proveden spektrofotometricky při vlnové délce 200 nm. Před každým dávkováním vzorku byla kapilára promyta po dobu 1,5 minuty základním elektrolytem do odpadní vialky a 0,5 minuty do výstupní vialky ze základním elektrolytem.

Příprava vždy čerstvých roztoků byla nutná jen v případě tetraargininu, který byl připravován ředěním 10 μ l zásobního vodného roztoku tetraargininu (10 mg/ml) 90 μ l základního elektrolytu (obvykle 10mM kyselina fosforečná) před každým měřením. O přípravě tetraargininu je více popsáno v kapitole 9.

Pokud je ve výsledcích zmiňován průměr ploch píků, vždy se jedná o aritmetický průměr ploch píků ze 3 měření. Pokud je plocha píku vyjádřena v procentech, jedná se o velikost průměrné plochy píku vztaženou na velikost průměrné plochy píku tetraargininu bez působení heparinu – „slepý vzorek“.

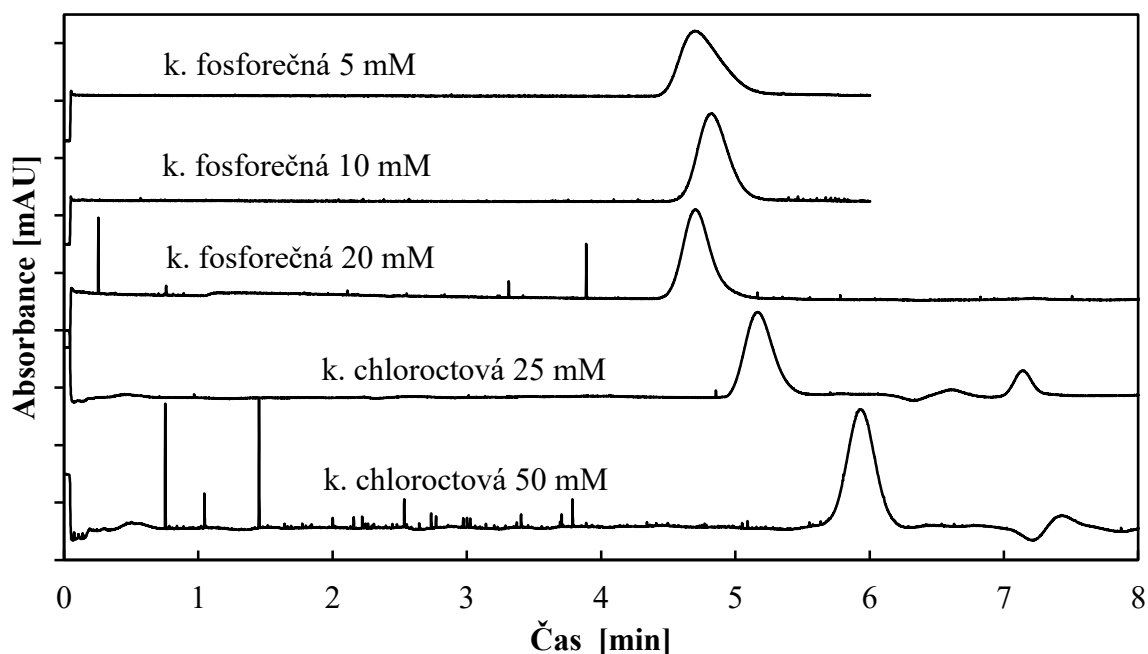
Odlišné parametry elektroforetické separace byly použity při měření mobility tetraargininu a elektroosmotického toku, o čemž pojednává kapitola 4.11.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Výběr základního elektrolytu

Nejprve bylo třeba ověřit, který základní elektrolyt (BGE) je optimální pro účel této práce a v jaké koncentraci. Na základě dříve získaných poznatků o chování elektrolytů^{51,55} byly zvoleny jako výchozí BGE roztoky kyseliny fosforečné nebo chloroctové o různých koncentracích. Koncentrace kyselin byly zvoleny z důvodu jejich srovnatelné velikosti vznikajícího proudu při vkládání napětí 30 kV. V rámci jiné závěrečné práce⁵⁶ byla sledována závislost velikosti proudu na velikosti vkládaného napětí. Vznikající proud pro základní elektrolyt 15 mM kyselinu fosforečnou a 50 mM kyselinu chloroctovou při vložení napětí 30 kV byl 41 μA , proto byly v této práci voleny koncentrace kyselin podobné těmto.

Tento proud byl ověřen a u kyseliny fosforečné o koncentraci 10 mM činil přibližně 35 μA . Byly zaznamenány elektroferogramy tetraargininu v těchto BGE (viz obr. 3), a to při koncentracích kyseliny fosforečné 5, 10 a 20 mM a kyseliny chloroctové 25 a 50 mM. Do kapiláry byl hydrodynamicky (5 kPa) po dobu 3 s nadávkován tetraarginin, vloženo napětí 30 kV po dobu 30 s a poté byl roztok v kapiláře tlakem mobilizován skrz detektor.



Obr. 3: Porovnání elektroferogramů v různých základních elektrolytech. Tetraarginin (1 mg/ml) dávkován tlakem 5 kPa po dobu 3 s; poté vloženo napětí 30 kV po dobu 30 s, následně mobilizace zóny skrz detektor tlakem 5 kPa. Jeden díl na ose y představuje absorbanci 10 mAU.

Rozhodujícími parametry pro volbu základního elektrolytu byly míra tvorby šumu a pro elektroferézu typických ostrých výkyvů signálu (tzv. spiků) na základní linii, celková stabilita základní linie a velikost proudu vznikajícího při vkládání napětí. Na základě porovnání elektroferogramů byl jako výchozí BGE zvolen 10 mM roztok kyseliny fosforečné. V tomto roztoku byly zaznamenány elektroferogramy bez spiků či výrazného šumu na základní linii a pík byl souměrný. V případě nižší koncentrace kyseliny fosforečné pík vykazoval chvostování. U vyšších koncentrací kyseliny fosforečné i chloroctové byly na základní linii zaznamenány četné spiky, které mohou vzniknout vlivem příliš vysokého elektrického proudu – mimo jiné se roztok v kapiláře přehřívá a tvoří se bublinky, které pak způsobí výkyvy signálu.

4.2 Volba doby vkládání napětí

Dalším parametrem, který bylo třeba optimalizovat, byl čas vkládání napětí na kapiláru. Jako základní elektrolyt byla použita 10 mM kyselina fosforečná s obsahem heparinu 10 µg/ml (důvod přidávání heparinu do BGE je vysvětlen v teoretické části práce, kapitole 4.5). Do kapiláry byl hydrodynamicky po dobu 3 s nadávkován tetraarginin, vloženo napětí 30 kV po dobu 5, 15, 30, 45, 60 nebo 90 s a poté byl roztok v kapiláře tlakem mobilizován skrz detektor. Získané elektroferogramy jsou zobrazeny na obr. 4.

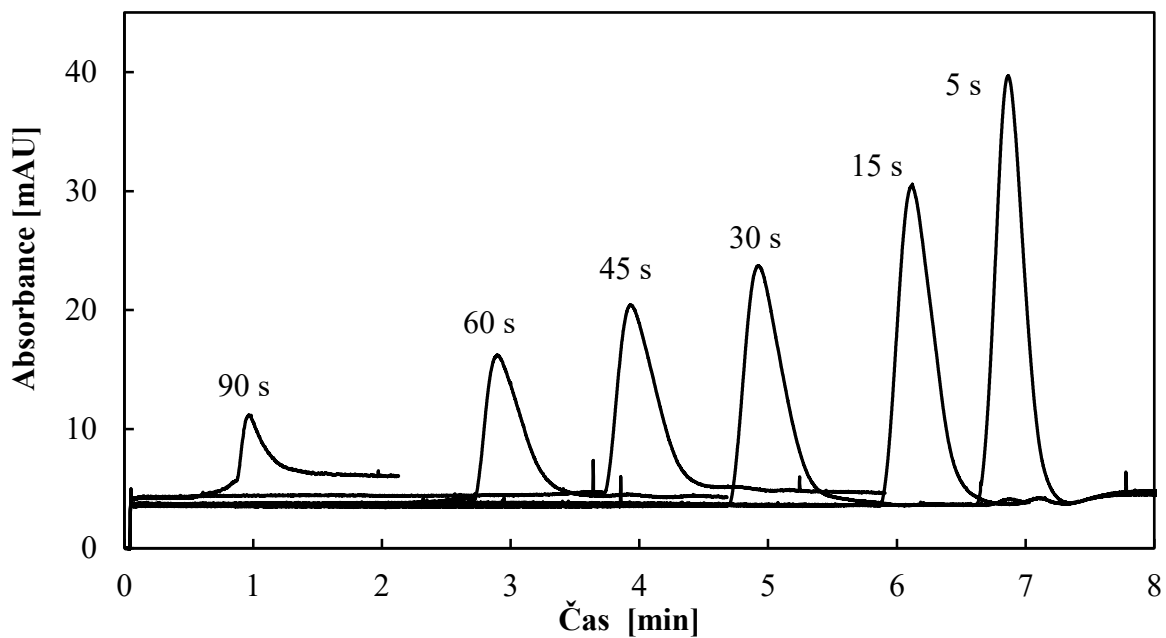
Rozhodujícím aspektem pro výběr optimální doby byla délka analýzy a tvar píku. Z vyzkoušených časů byl vybrán čas 30 s. Pík tetraargininu byl při tomto čase vkládání napětí zaznamenáván přibližně po 5 minutách analýzy. Při delším čase vkládání napětí byly píky zaznamenávány sice vždy o minutu dříve, ale lze rozpoznat, že postupně dochází k jejich rozmývání a chvostování. Při kratším čase vkládání napětí byly naopak píky zaznamenány později, ale méně rozmyté a symetričtější.

Také dochází ke snížení citlivosti metody, a to tak, že při kratším čase vkládání napětí dojde ke kontaktu mezi menším počtem molekul heparinu a tetraargininu. Jelikož ke kontaktu tetraargininu a heparinu dochází pouze po dobu, kdy je na kapiláru vloženo napětí, mělo by prodloužení doby vkládání napětí vést ke zmenšení píku přímo úměrně této době vkládání napětí. Zvolená doba 30 s vkládání napětí byla kompromisem mezi tvarem píku, délkou analýzy a očekávanou citlivostí metody.

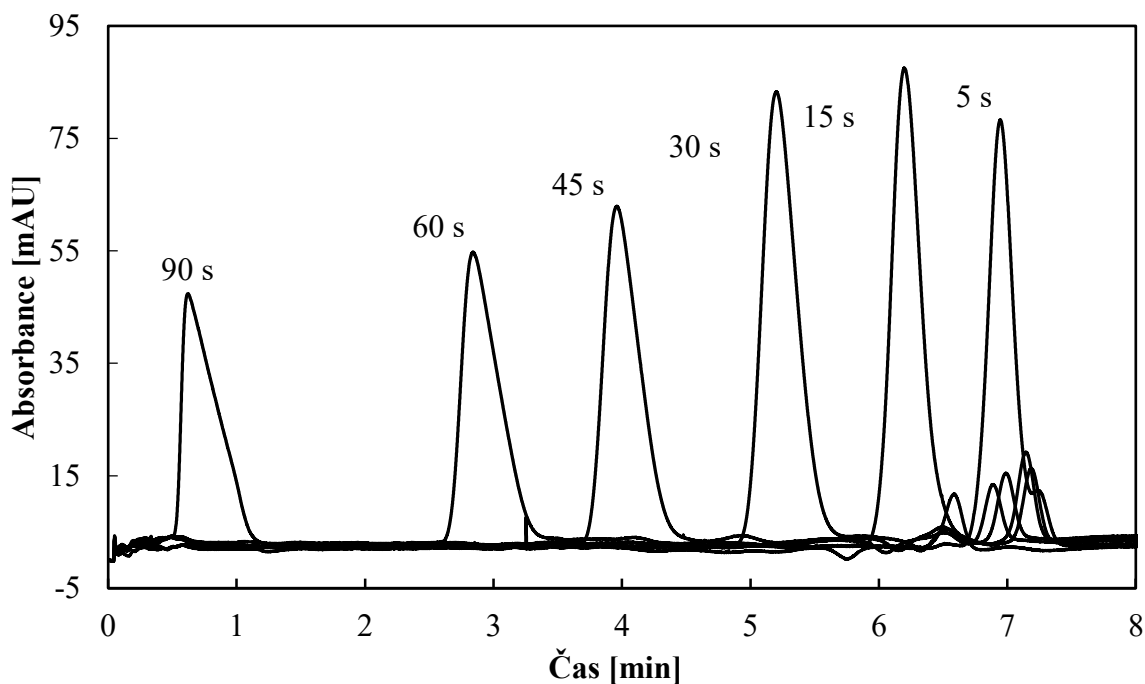
Stejný postup byl proveden pro základní elektrolyt 50 mM kyselinu chloroctovou s heparinem o koncentraci 5 µg/ml. Elektroferogramy jsou k porovnání na obr. 5. V tomto případě jsou píky ostré, ovšem základní linie vykazuje určitou nestabilitu.

Toto měření bylo provedeno v obou kyselinách pro kontrolní porovnání – i když byl za výchozí základní elektrolyt již v předchozí kapitole vybrán 10 mM roztok kyseliny fosforečné, mohlo se ukázat, že budou v kyselině chloroctové naměřeny při změně doby vkládání napětí odlišné elektroferogramy. Ze závislosti velikosti plochy píku na době vkládání napětí v základním elektrolytu je ale patrné, že v případě použití 10 mM kyseliny fosforečné je závislost lineární (což odpovídá výše uvedenému teoretickému předpokladu), přičemž při použití 50 mM kyseliny chloroctové nikoliv (viz obr. 6). Tuto

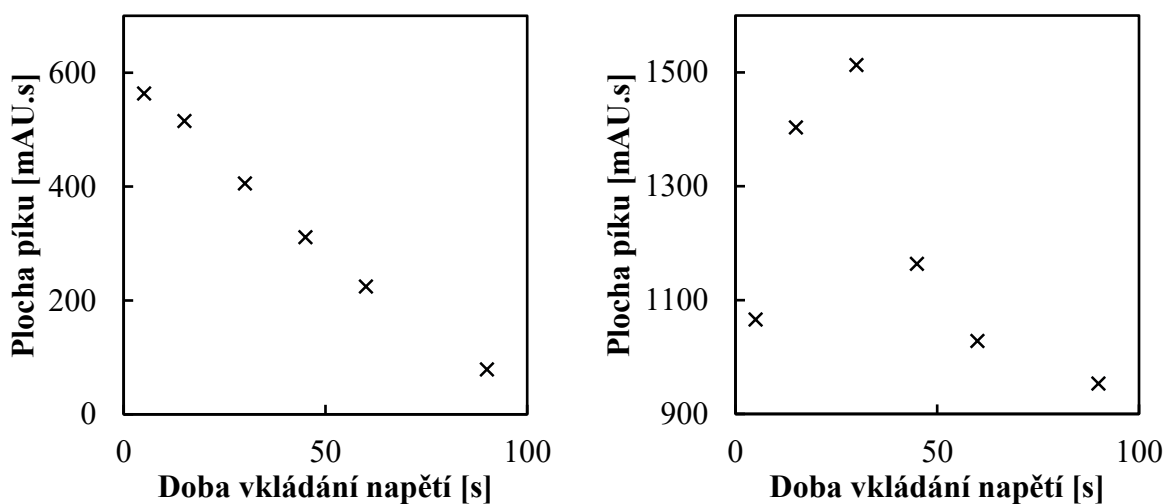
odlišnost mezi oběma kyselinami nelze jednoznačně vysvětlit.



Obr. 4: Porovnání elektroferogramů s různými časy vkládání napětí 30 kV na kapiláru. Základní elektrolyt: 10 mM kyselina fosforečná s 10 $\mu\text{g/ml}$ heparinu; dávkován tetraarginin (1 mg/ml) 5 kPa, 3s.



Obr. 5: Porovnání elektroferogramů s různými časy vkladání napětí 30 kV na kapiláru. Základní elektrolyt: 50 mM kyselina chloroctová s 5 $\mu\text{g/ml}$ heparinu; dávkován tetraarginin 5 kPa, 3s.

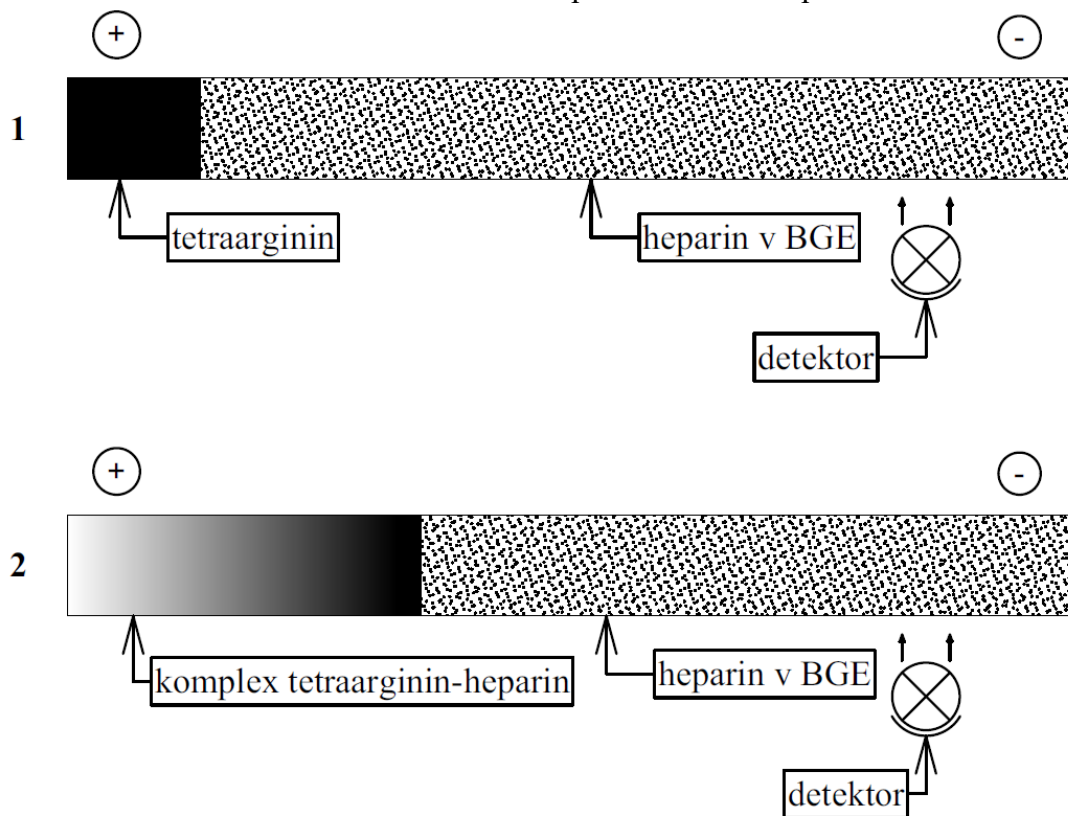


Obr. 6: Porovnání závislosti ploch píků na době vkladání napětí – vlevo závislost v základním elektrolytu 10 mM kyseliny fosforečné s 10 $\mu\text{g/ml}$ heparinu; vpravo v základním elektrolytu 50 mM kyseliny chloroctové s 5 $\mu\text{g/ml}$ heparinu.

4.3 Kalibrační závislosti v základním uspořádání

Byly proměřeny kalibrační závislosti za účelem porovnání vlivu změny parametrů nastavení metody. Byly připraveny kalibrační roztoky ředěním zásobního roztoku heparinu o koncentraci 1 mg/ml roztokem základního elektrolytu, a to vždy do dvou vialek (koncentrace heparinu 0, 1, 2, 5, 10, 15 a 20 $\mu\text{g/ml}$). Roztoky byly připravovány do dvou vialek, protože byla použita metoda, kdy byl heparin přítomen v celém objemu základního elektrolytu.

Do kapiláry byl dávkován tetraarginin jako krátká zóna tlakem 5 kPa po dobu 3 s, poté bylo na kapiláru vloženo napětí 30 kV po dobu 30 s a zóny byly mobilizovány tlakem směrem k detektoru. Schéma tohoto experimentálního uspořádání viz obr. 7.

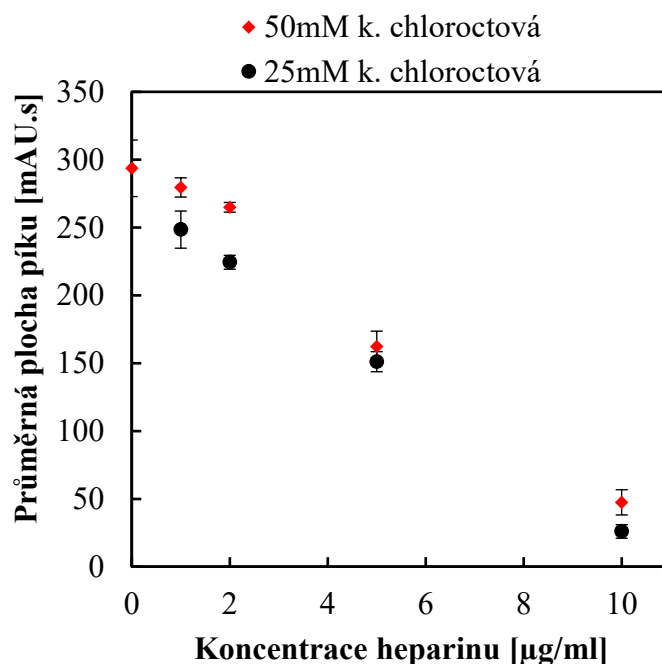


Obr. 7: Schéma experimentálního uspořádání, kdy je heparin přítomen v celém základním elektrolytu – ukázka pohybu zón v kapiláře. V první fázi je hydrodynamicky dávkován tetraarginin jako krátká zóna. Heparin je přítomen přímo v základním elektrolytu. V druhé fázi je na kapiláru vloženo napětí a molekuly migrují, tetraarginin s heparinem vytváří komplex. Tento komplex a ostatní zóny jsou poté mobilizovány tlakem skrz detektor, přičemž je sledována absorbance roztoku, kterou způsobuje zbylý tetraarginin.

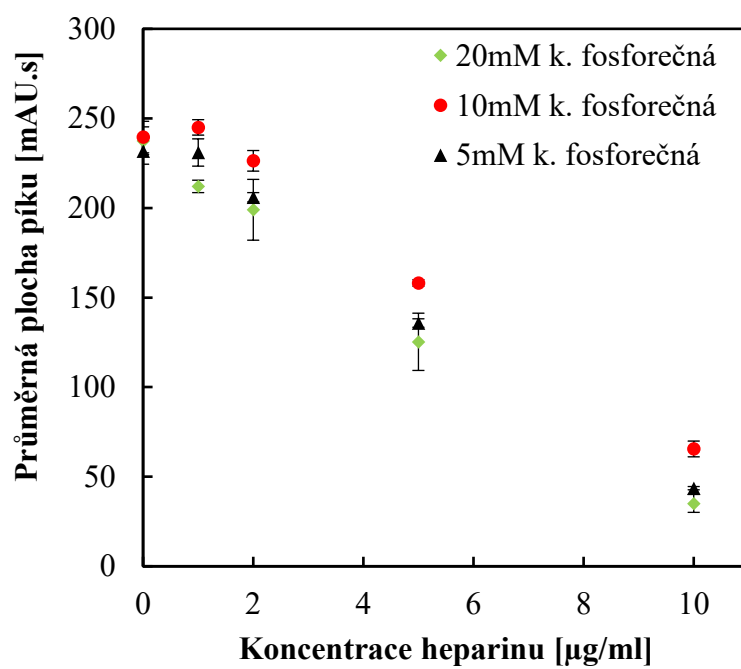
Byla proměřena závislost plochy píku na koncentraci heparinu v roztoku v základních elektrolytech 25 mM a 50 mM kyselině chloroctové – závislost byla proměřena jen v rozsahu 0 až 10 $\mu\text{g/ml}$ heparinu, při vyšších koncentracích nebyl zaznamenán pík tetraargininu. To lze vidět na obr. 8, kdy je patrné, že již koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ heparinu odpovídá téměř nulová hodnota plochy píku a vyšší koncentrace heparinu tedy znemožňují kvantifikaci – pík tetraargininu zcela zmizí.

V základním elektrolytu kyselině fosforečné o koncentraci 5, 10 nebo 20 mM byly proměřeny stejné kalibrační závislosti – porovnání viz obr. 9.

Měření v kyselině chloroctové měla v obou případech vyšší směrodatné odchylky, stejně tak jako v 20 mM kyselině fosforečné. To mohlo být způsobeno vyšší koncentrací iontů v roztoku vedoucí k vyššímu elektrickému proudu. V kyselině fosforečné byl ovšem zaznamenán počáteční úsek kalibrační závislosti, který neklesá přímo úměrně koncentraci heparinu. Nelze jednoznačně říci, čím může být tato odchylka úseku kalibrační závislosti tvořena.

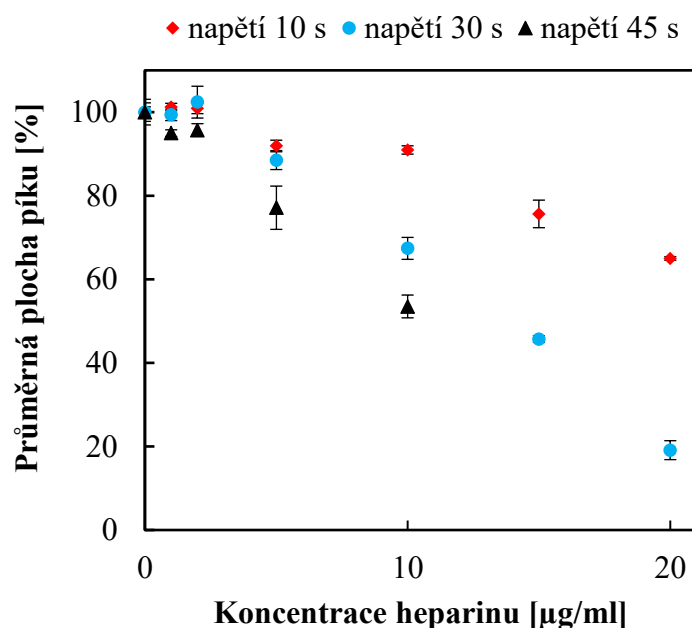


Obr. 8: Závislost průměrné plochy píku na koncentraci heparinu s různými koncentracemi kyseliny chloroctové. Základní elektrolyt: kyselina chloroctová s heparinem o koncentraci 0 – 10 $\mu\text{g/ml}$.



Obr. 9: Závislost průměrné plochy píku na koncentraci heparinu s různými koncentracemi kyseliny fosforečné. Základní elektrolyt: kyselina fosforečná s heparinem o koncentraci 0 – 10 µg/ml.

Se zvoleným základním elektrolytem 10 mM kyselinou fosforečnou a heparinem v celém objemu byly proměřeny kalibrační závislosti (obr. 10), přičemž byla použita vždy odlišná doba vkládání napětí na kapiláru (10, 30 a 45 s). Jak již bylo zmíněno, při kratší době vkládání napětí se setká méně molekul heparinu a tetraargininu, tudíž kalibrační závislost by měla mít nižší hodnotu směrnice (citlivost) – toto se měřením potvrdilo. Vkládání napětí po dobu 45 s také potvrzuje teoretický předpoklad, a to setkání mnoha molekul a téměř vymizení píku – nemožnost stanovit vyšší koncentrace heparinu (hodnoty pro 15 a 20 mg/ml v grafu chybí, nebyly naměřeny). Vkládání napětí po dobu 30 s se potvrdilo jako optimální, ovšem průměrná plocha píku je nepřímě úměrná až od určité koncentrace heparinu v roztoku. Od nulové koncentrace do 2 $\mu\text{g/ml}$ lze pozorovat mírně rostoucí (vkládání napětí 30 s) nebo téměř konstantní (při vkládání napětí 10 s) úsek kalibrační závislosti, který byl již pozorován při předchozím měření a nelze jednoznačně vysvětlit jeho vznik.

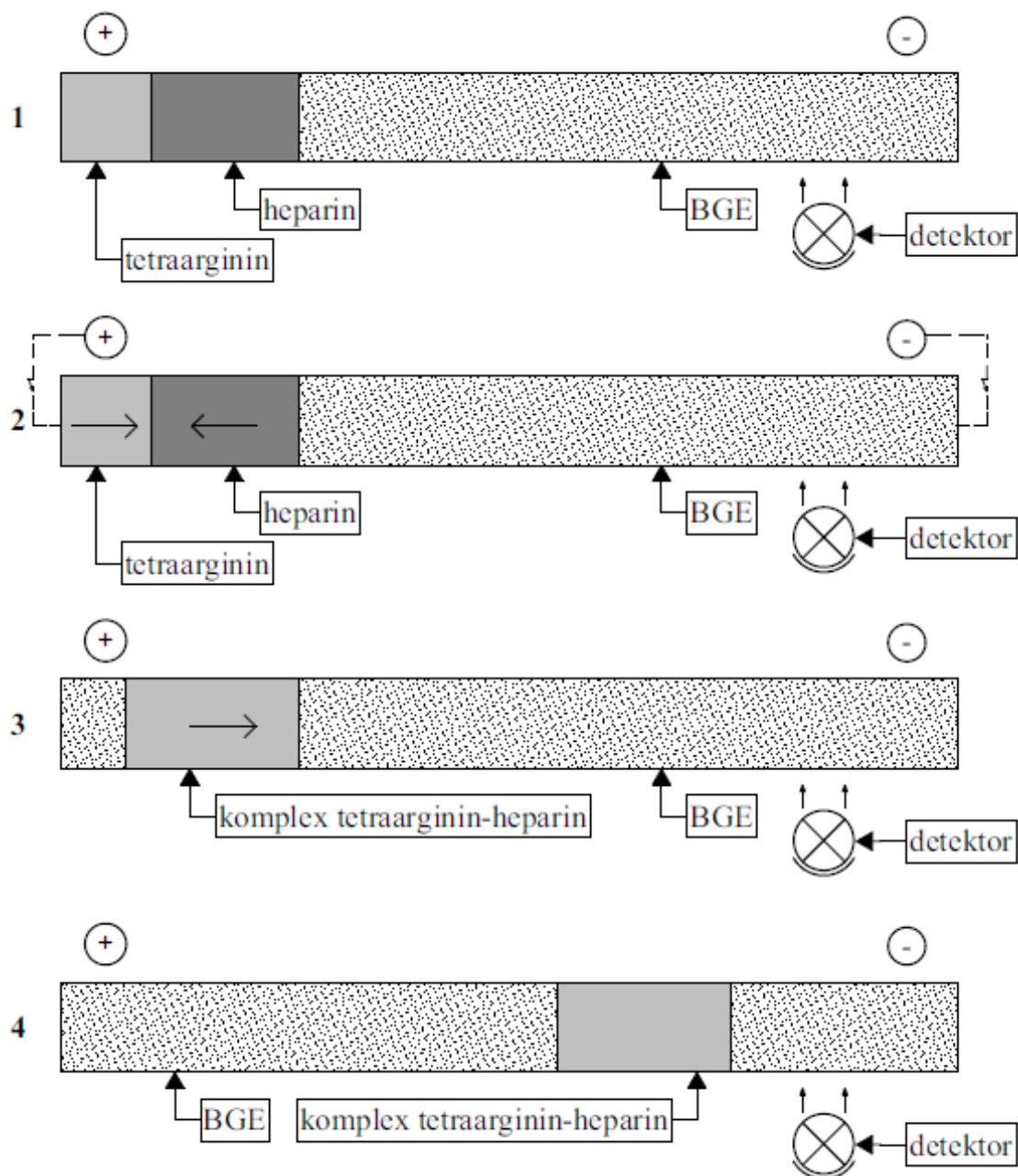


Obr. 10: Závislost průměrné plochy píku na koncentraci heparinu s různými dobami vkládání napětí na kapiláru po nadávkování tetraargininu. Základní elektrolyt: 10mM kyselina fosforečná s heparinem o koncentraci 0 – 20 $\mu\text{g/ml}$. Průměrné plochy píku jsou zde pro přehlednost znázorněny jako procenta průměrné plochy píku prvního bodu kalibrace (nulová koncentrace heparinu).

4.4 Změna experimentálního uspořádání

Dalším bodem této práce bylo změnit experimentální uspořádání metody tak, aby byl roztok heparinu (tzn. vzorek) do kapiláry dávkován jako zóna, nikoliv jako součást celého objemu základního elektrolytu. Vzhledem k nábojům látek a polaritě napětí byl negativně nabitý heparin dávkován jako první a bezprostředně poté byl dávkován kladně nabitý tetraarginin. Oba roztoky byly dávkovány hydrodynamicky tlakem 5 kPa. Heparin byl dávkován po různě dlouhé časy, tetraarginin po dobu 3 s (pokud není uvedeno jinak). Ihned po nadávkování zón bylo na kapiláru vloženo napětí 30 kV po dobu 30 s a poté byly vzniklé zóny mobilizovány tlakem skrz detektor. Princip tohoto „zónového uspořádání“ je schematicky znázorněn na obr. 11.

Vždy byl změněn jeden parametr a proměřena kalibrační závislost. Na základě získaných údajů bylo vyhodnoceno, jaké nastavení bude v metodě dále používáno. Přehled sledovaných parametrů a naměřené hodnoty jsou uvedeny v dalších kapitolách.



Obr. 11: V prvním kroku jsou do kapiláry nadávkovány 2 zóny – první zóna heparinu, ihned poté zóna tetraargininu. Dávkovány jsou tlakem 5 kPa po různě dlouhé časy (heparin v desítkách sekund, tetraarginin obvykle 3 s). Základní elektrolyt je 10 mM kyselina fosforečná. Ve druhém kroku je na kapiláru vloženo napětí 30 kV a zóny migrují proti sobě vlivem jejich náboje a polarity vkládaného napětí. Třetí krok znázorňuje vznik komplexu tetraarginin-heparin během vkládání napětí, na což navazuje čtvrtý krok, kterým je mobilizace vzniklých zón skrz detektor, kdy další komplex nevzniká, jelikož se molekuly tetraargininu s molekulami heparinu již nepotkávají.

4.5 Volba délky dávkované zóny heparinu

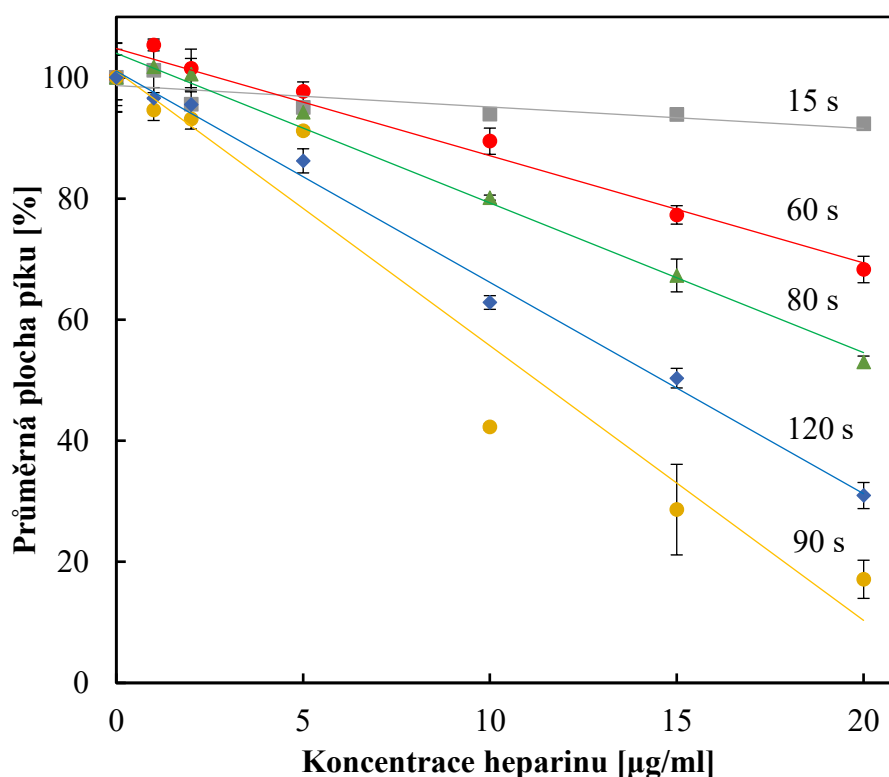
Délka dávkované zóny heparinu (vzorku) je klíčovým parametrem – pokud by bylo heparinu v kapiláře příliš, či pokud by délkou vkládání napětí došlo ke kontaktu příliš mnoha molekul tetraargininu s heparinem, došlo by k vychytání veškerého tetraargininu – sledovaný pík by zcela zmizel. Tímto by se snížila horní hranice lineárního rozsahu metody. Naopak při nedostatku vzorku by změna velikosti píku tetraargininu nemusela být dostatečně patrná, tím by došlo ke snížení citlivosti metody.

Pro zjištění optimální délky dávkované zóny byly proměřeny kalibrační závislosti v rozsahu 0 – 20 $\mu\text{g/ml}$ heparinu, přičemž zóna heparinu byla dávkována vždy 15, 60, 80, 90 nebo 120 sekund tlakem 5 kPa. Po nadávkování zóny heparinu byla tlakem dávkována zóna tetraargininu po dobu 3 s, na kapiláru bylo vloženo napětí 30 kV po dobu 30 s a vzniklé zóny mobilizovány tlakem.

Na obr. 12 je vidět rozdíl mezi získanými kalibračními závislostmi. Při nejkratším čase dávkování heparinu (15 s) je směrnice regresní přímky rovna $-0,35 \text{ ml} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ (jde o téměř konstantní funkci) – v tomto případě by se jednalo o velmi sníženou citlivost metody, která by byla nepoužitelná. S prodlužující se dobou dávkování heparinu roste absolutní hodnota směrnice regresní přímky k přijatelným hodnotám. Z tohoto trendu vybočuje doba dávkování 90 s. Vzhledem k tomu, že tato kalibrační závislost vykazuje nižší koeficient determinace a vyšší směrodatné odchylky jednotlivých měření, je pravděpodobné, že došlo k blíže nespecifikované experimentální chybě. Volbou pro další měření byla doba dávkování heparinu 120 s, jelikož při tomto čase kalibrační závislost vykazovala lepší koeficient determinace i nižší směrodatné odchylky jednotlivých měření. Parametry regresních přímek jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Přehled parametrů regresních přímek z obr. 12

| Doba dávkování zóny heparinu [s] | Směrnice přímky [$\text{ml} \cdot \mu\text{g}^{-1}$] | Koeficient determinace R^2 |
|----------------------------------|--|------------------------------|
| 15 | -0,35 | 0,67 |
| 60 | -1,77 | 0,97 |
| 80 | -2,47 | 0,99 |
| 90 | -4,54 | 0,95 |
| 120 | -3,49 | 0,99 |



Obr. 12: Porovnání kalibračních závislostí průměrné velikosti plochy píku na koncentraci heparinu v roztoku. Základní elektrolyt: kyselina fosforečná 10 mM; dávkována zóna roztoku heparinu o koncentraci 0 – 20 $\mu\text{g/ml}$ hydrodynamicky (5 kPa) po různě dlouhé časy (viz popisky); ihned poté dávkován tetraarginin 5 kPa do dobu 3 s, poté vloženo 30 s napětí 30 kV a vzniklé zóny mobilizovány tlakem 5 kPa skrz detektor. Průměrné plochy píku jsou zde pro přehlednost znázorněny jako procenta průměrné plochy píku prvního bodu kalibrace (nulová koncentrace heparinu).

4.6 Metoda se standardním přídatkem

V oblasti nízkých koncentrací roztoků heparinu (přibližně od 0 do 2 $\mu\text{g/ml}$) byl pozorován nelineární průběh funkce a vyšší směrodatná odchylka jednotlivých měření. V případě analýzy heparinu jsou nejdůležitější právě tyto nižší hodnoty, protože obvyklá hladina heparinu v těle se pohybuje okolo 1,0 – 2,5 $\mu\text{g/ml}$ ⁵⁷. V předchozích grafech je vidět, že při vyšších koncentracích heparinu je kalibrační závislost lineární, byla proto jako další předmět zkoušení zvolena metoda, kdy byl ke kalibračním roztokům přidán roztok heparinu – v rámci této práce lze takový způsob měření nazvat „metodou standardního přídatku“.

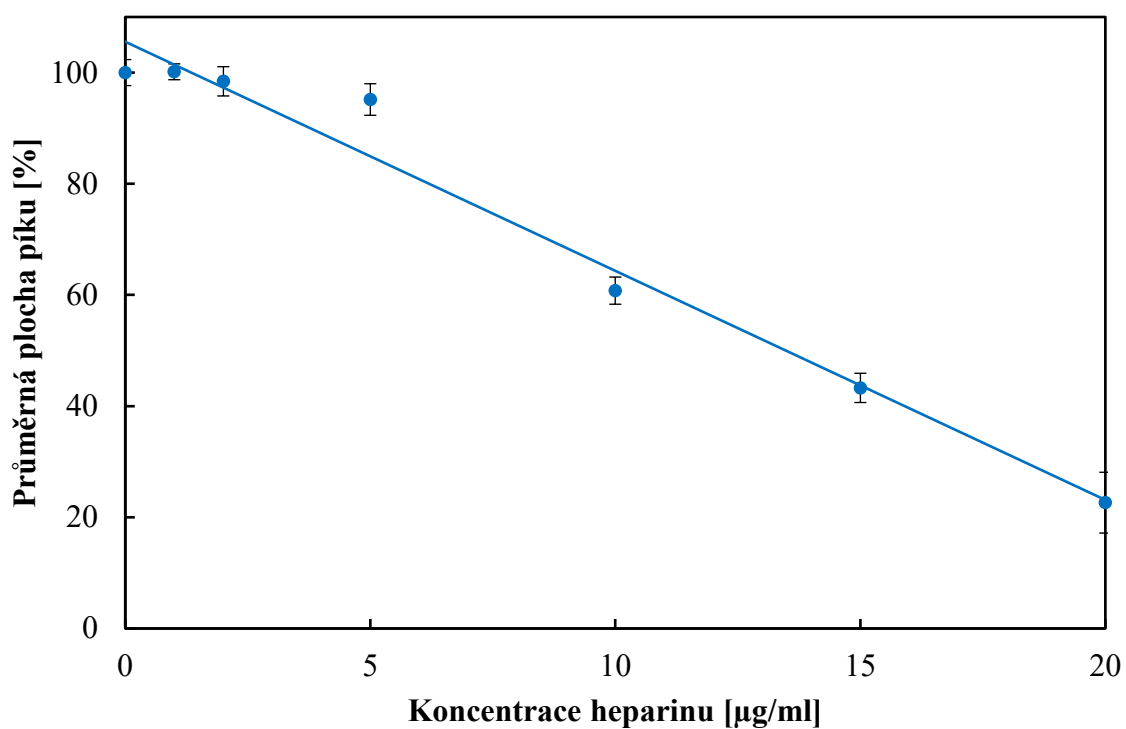
Ke všem kalibračním roztokům bylo přidáno 5 μl roztoku heparinu o koncentraci 1 mg/ml , výsledná koncentrace heparinu poté v jednotlivých kalibračních roztocích činila o 10 $\mu\text{g/ml}$ více, než v původních roztocích. S těmito roztoky byly opět proměřeny kalibrační závislosti.

Protože bylo předpokládáno, že zvýšení koncentrace heparinu v roztocích by mohlo vést k vychytání veškerého tetraargininu (a vymizení píku), byla doba dávkování tetraargininu prodloužena z běžných 3 s na 5 s. Během měření byly proměňovány časy dávkování zóny heparinu.

Nejvyšší citlivost i koeficient determinace (viz tabulka 2) byly potvrzeny při použití doby dávkování heparinu 120 s. Téměř konstantní úsek počátku kalibrační závislosti ovšem standardním přídatkem nebyl odstraněn, i když bylo pozorováno snížení směrodatné odchylky jednotlivých měření (viz obr. 13).

Tabulka 2: Přehled parametrů regresních přímek kalibračních závislostí

| Doba dávkování zóny heparinu [s] | Směrnice přímky [$\text{ml} \cdot \mu\text{g}^{-1}$] | Koeficient determinace R^2 |
|----------------------------------|--|------------------------------|
| 60 | -2,04 | 0,91 |
| 90 | -2,75 | 0,91 |
| 110 | -3,00 | 0,97 |
| 120 | -4,12 | 0,98 |



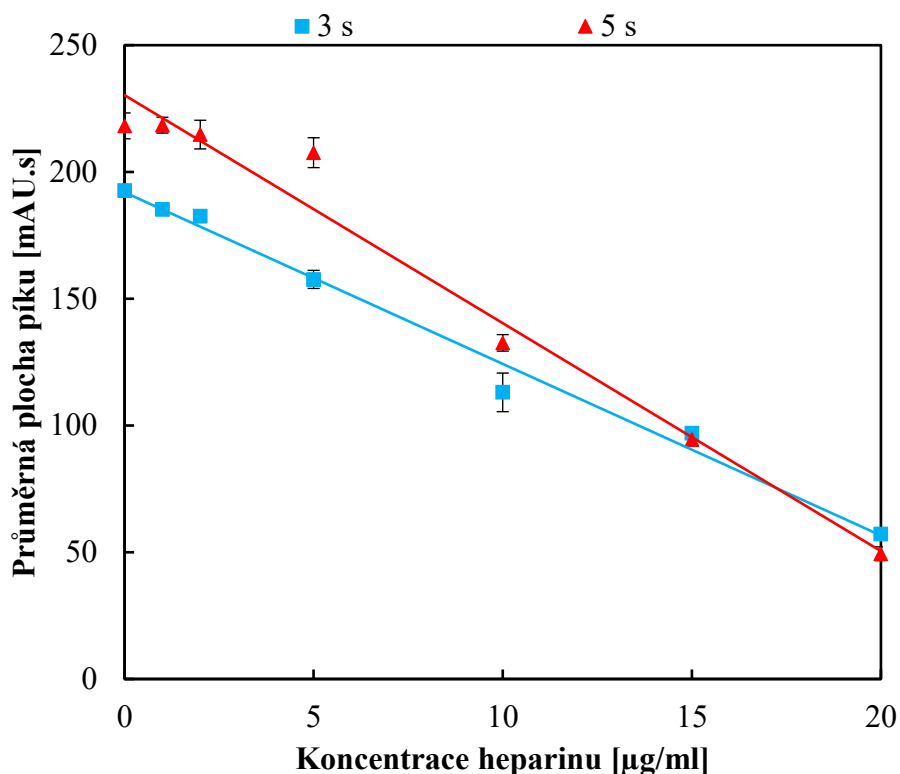
Obr. 13: Porovnání kalibračních závislostí. Tlakem dávkován heparin o koncentraci 0 – 20 µg/ml po dobu 120 s; bezprostředně poté dávkován tlakem tetraarginin po dobu 5 s, poté vloženo napětí 30 kV po dobu 30 s a zóny mobilizovány skrz detektor tlakem. Ke kalibračním roztokům byl přímo do vialky přidán standardní přídavek roztoku heparinu. Průměrné plochy píku jsou zde pro přehlednost znázorněny jako procenta průměrné plochy píku prvního bodu kalibrace (nulová koncentrace heparinu).

4.7 Dávkování tetraargininu

Byly porovnány kalibrační závislosti (viz obr. 14) při různé době dávkování zóny tetraargininu – roztoky se standardním přídávkem byly dávkovány po dobu 120 s, poté byl dávkován tetraarginin po dobu 3 s nebo 5 s. Při větším množství tetraargininu je vidět, že metoda má větší citlivost při vyšších hladinách heparinu, ale má větší směrodatné odchylky jednotlivých měření. Naopak při dávkování tetraargininu po dobu 3 s metoda vykazuje větší linearitu v celém kalibračním rozsahu a v oblasti nízkých koncentrací má menší směrodatné odchylky měření.

Tabulka 3: Přehled parametrů regresních přímek z obr. 14

| Doba dávkování zóny tetraargininu [s] | Směrnice přímky [mAU·s·ml·μg ⁻¹] | Koeficient determinace R ² |
|---------------------------------------|--|---------------------------------------|
| 3 | -6,77 | 0,99 |
| 5 | -8,99 | 0,98 |



Obr. 14: Porovnání kalibračních závislostí. Tlakem dávkován heparin o koncentraci 0–20 µg/ml 120 s; bezprostředně poté dávkován tlakem tetraarginin po dobu 3 nebo 5 s, poté vloženo napětí 30 kV po dobu 30 s a zóny mobilizovány skrz detektor tlakem. Ke kalibračním roztokům byl přímo do vialky přidán standardní přídavek – koncentrace kalibračních roztoků byla navýšena o 10 µg/ml.

4.8 Přídavek hydroxyethylcelulosity do základního elektrolytu

Do základního elektrolytu se při elektroforetických metodách přidává roztok hydroxyethylcelulosity pro omezení elektroosmotického toku. Přídavek hydroxyethylcelulosity do základního elektrolytu prodlouží celkovou dobu analýzy, ale může snížit šum základní linie a tím zlepšit citlivost a opakovatelnost jednotlivých měření. V případě práce s bazickými peptidy také potlačí jejich nežádoucí interakce se stěnou kapiláry.

Do vialek se základním elektrolytem byl přidán 1% roztok hydroxyethylcelulosity tak, aby její koncentrace ve výsledném základním elektrolytu byla 0,1 %. Poté byla tímto elektrolytem důkladně promyta kapilára a následovalo další měření.

S takto upraveným základním elektrolytem a kapilárou byly proměřeny kalibrační závislosti. Znovu byl sledován vliv změny doby dávkování tetraargininu (dávkován byl hydrodynamicky 3, 4, 5 a 6 s).

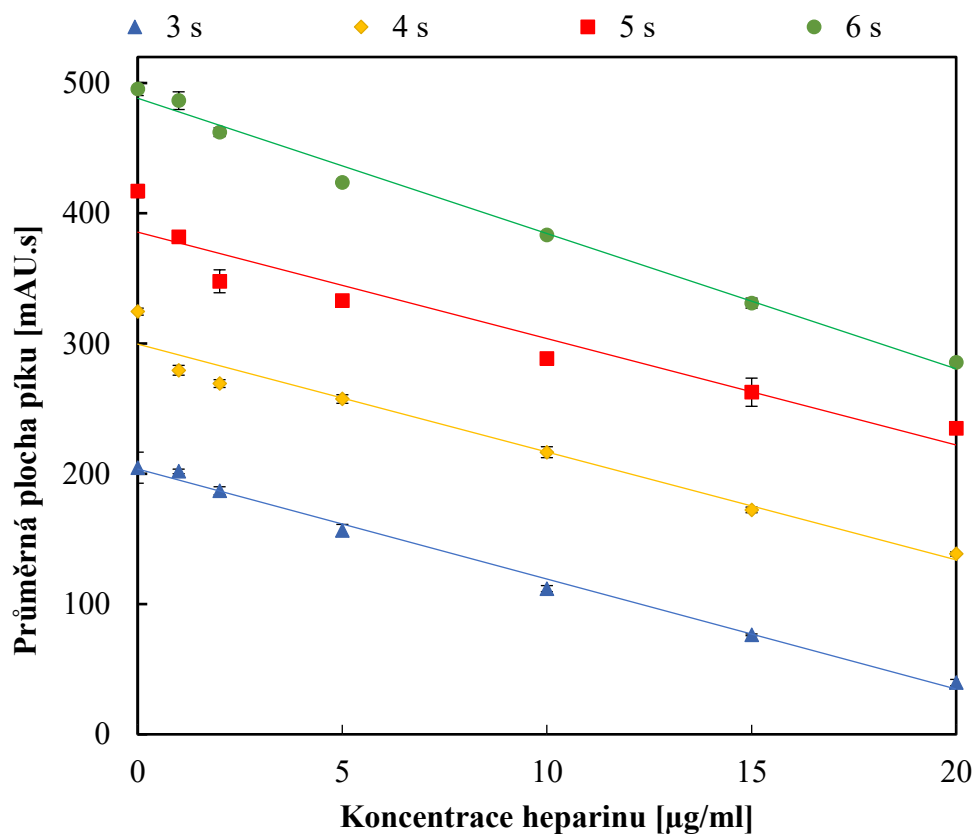
Ukázalo se, že změna doby dávkování tetraargininu skutečně nemá kromě změny výchozí hodnoty plochy píku příliš zásadní vliv na průběh kalibrační závislosti nebo citlivost metody. Jediná výrazná změna, a to změna úseku na ose y je způsobena právě množstvím tetraargininu, který je nadávkován do kapiláry – je-li dávkován déle, zóna je delší a to se projeví větší plochou píku tetraargininu při nulové koncentraci heparinu. Výhodou delší zóny tetraargininu by byla možnost většího lineárního rozsahu metody, protože větší množství tetraargininu poskytuje rozsáhlejší možnost úbytku píku, tudíž teoreticky dokáže zaznamenat případně vyšší koncentrace heparinu. V této práci ovšem bylo jako maximální koncentrace použito 20 µg/ml heparinu, takže nebyla dávkována delší zóna tetraargininu. Porovnání naměřených kalibračních závislostí a parametry regresních přímk kalibračních závislostí viz tabulka 4 a obr. 15.

Zároveň je z naměřených kalibračních závislostí patrné, že přídavek hydroxyethylcelulosy měl pozitivní vliv na počáteční úsek kalibračních závislostí – výrazně nelineární, téměř rostoucí úsek, pozorovaný při předchozích měřeních při těchto měřeních nebyl zaznamenán.

Doba analýzy se přídavkem hydroxyethylcelulosy prodloužila z původních 6 minut na 11 minut.

Tabulka 4: Přehled parametrů regresních přímek z obr. 15

| Doba dávkování zóny tetraargininu [s] | Směrnice přímky [mAU·s·ml·μg ⁻¹] | Úsek přímky [mAU·s] | Koeficient determinace R ² |
|---------------------------------------|--|---------------------|---------------------------------------|
| 3 | -8,45 | 203,7 | 0,99 |
| 4 | -8,28 | 299,6 | 0,96 |
| 5 | -8,17 | 385,5 | 0,92 |
| 6 | -10,39 | 488,3 | 0,99 |



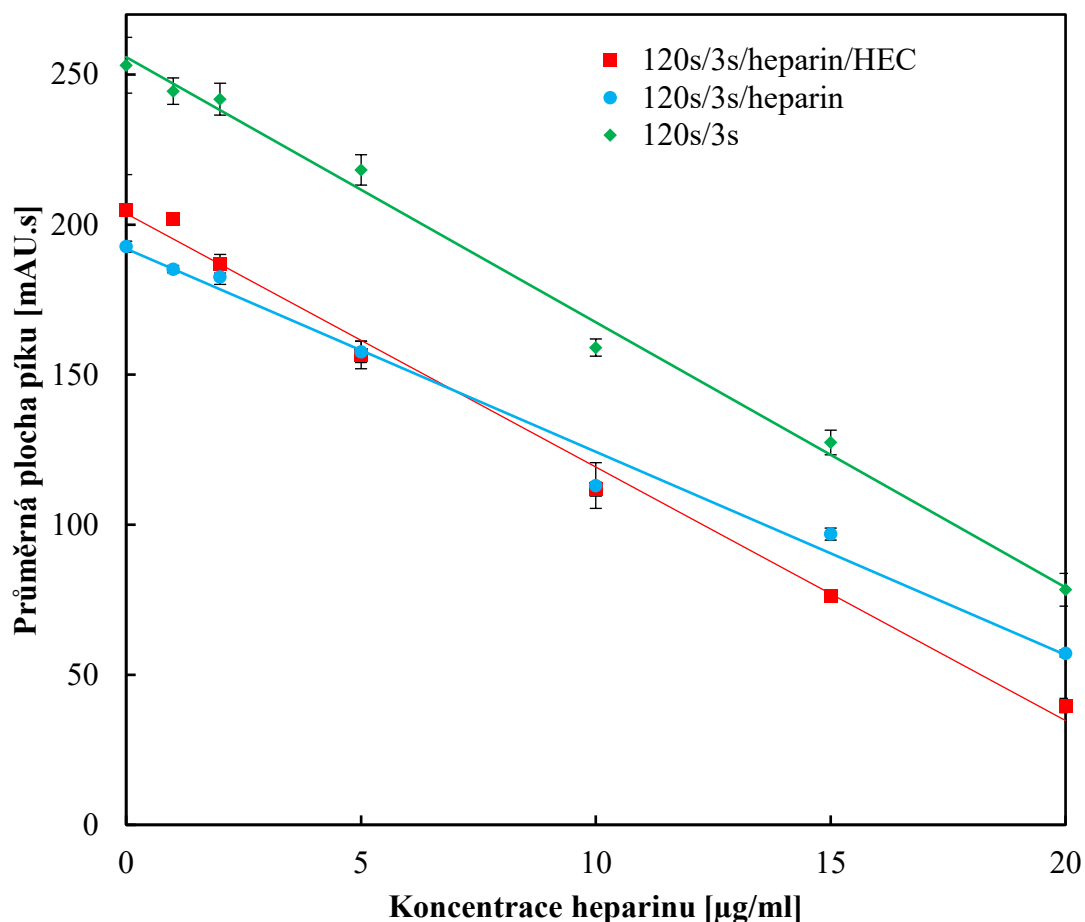
Obr. 15: Porovnání kalibračních závislostí. Tlakem dávkován heparin o koncentraci 0 – 20 μg/ml 120 s; bezprostředně poté dávkován tlakem tetraarginin po dobu 3, 4, 5 nebo 6 s, poté vloženo napětí 30 kV po dobu 30 s a zóny mobilizovány skrz detektor tlakem. Ke kalibračním roztokům byl přímo do vialky přidán standardní přídavek – koncentrace kalibračních roztoků byla navýšena o 10 μg/ml.

Na závěr je zde třeba uvést přehledné porovnání vybraných kalibračních závislostí z výše popsaných experimentů, a to metodu bez standardního přídávku, se standardním přídávkem bez hydroxyethylcelulosity a s přídávkem hydroxyethylcelulosity, kdy byla do kapiláry dávkována zóna heparinu do dobu 120, poté zóna tetraargininu po dobu 3 s, vloženo napětí 30 kV po dobu 30 s a vzniklé zóny mobilizovány tlakem skrz detektor z kapiláry. Tyto kalibrační závislosti jsou k porovnání v obr. 16 a v tabulce 5 jsou parametry příslušných regresních přímek.

U metody bez přídávků jsou znát větší směrodatné odchylky jednotlivých měření a metoda se standardním přídávkem bez hydroxyethylcelulosity vykazuje nižší citlivost. Ale celkově jsou metody srovnatelné, dalším porovnávacím faktorem je zde čas – ten je v přítomnosti hydroxyethylcelulosity vyšší, protože se zpomalí proudění kapaliny v kapiláře díky zvýšení viskozity roztoku. Rozdílný úsek na ose y je způsoben přidáváním heparinu ke kalibračním roztokům, kdy se v důsledku toho posune celá kalibrační závislost směrem dolů – je tedy omezena horní mez lineárního rozsahu metody. Proto je třeba uvažovat, chceme-li metodu dále optimalizovat pro co nejrozsáhlejší dynamický rozsah i za cenu nižší přesnosti a citlivosti, nebo se zaměřit na optimalizaci podmínek pro stanovování jen nižších koncentrací heparinu.

Tabulka 5: Přehled parametrů regresních přímek z obr. 16

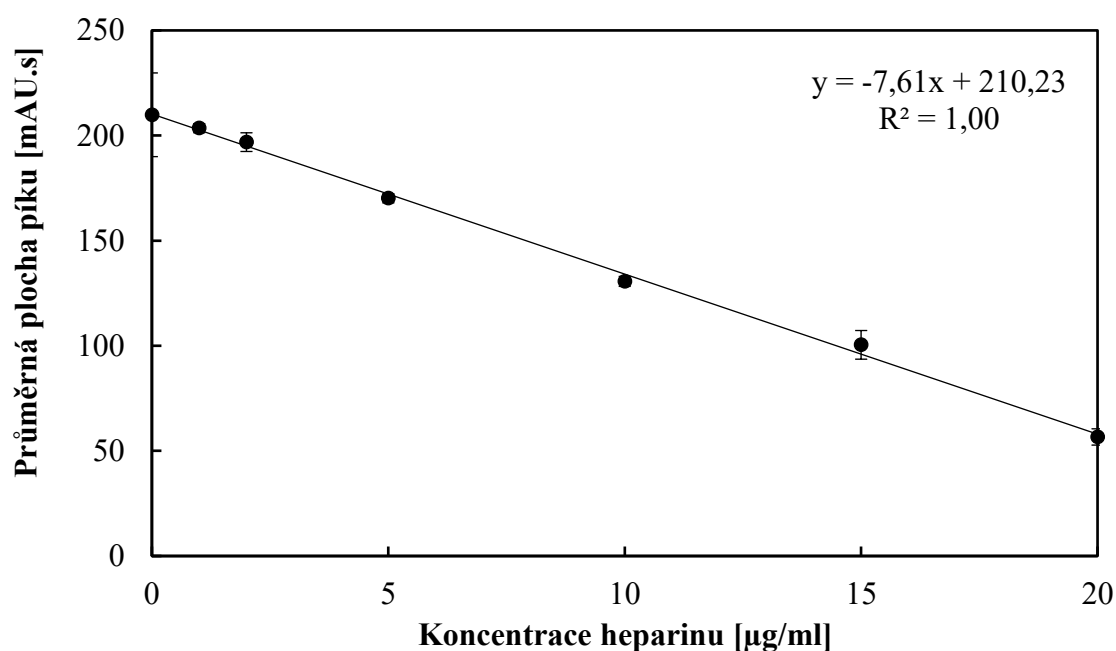
| Metoda | Směrnice přímky [mAU·s·ml·μg ⁻¹] | Úsek přímky [mAU·s] | Koeficient determinace R ² |
|---------------------------------------|---|------------------------|--|
| Bez přídávků | -8,83 | 255,8 | 0,99 |
| Standardní přídavek heparinu | -6,77 | 192,0 | 0,99 |
| Standardní přídavek heparinu a HEC | -8,45 | 203,7 | 0,99 |



Obr. 16: Porovnání kalibračních závislostí. Tlakem dávkován heparin o koncentraci 0 – 20 $\mu\text{g/ml}$ 120 s; bezprostředně poté dávkován tlakem tetraarginin po dobu 3 s, poté vloženo napětí 30 kV po dobu 30 s a zóny mobilizovány skrz detektor tlakem. Totéž bylo provedeno poté, co byl ke kalibračním roztokům přímo do vialky přidán standardní přídavek roztoku heparinu. Třetí kalibrační závislost byla naměřena stejným způsobem po přidání hydroxyethylcelulosy do základního elektrolytu.

4.9 Určení pracovních charakteristik metody

Za účelem určení pracovních charakteristik metody (meze detekce, meze stanovitelnosti) byla za zvolených podmínek proměřena kalibrační závislost v rozsahu 0 – 20 µg/ml heparinu. Získaná kalibrační závislost viz obr. 17, bylo provedeno měření vždy třikrát, přičemž roztoky o koncentraci 2 a 15 µg/ml byly proměřeny desetkrát. Spočítané LOD a LOQ společně s relativními směrodatnými odchylkami jsou uvedeny v tabulce 6.



Obr. 17: Kalibrační závislost velikosti plochy píku na koncentraci heparinu získaná za zvolených podmínek, sloužící k výpočtu pracovních charakteristik metody. Základní elektrolyt: kyselina fosforečná 10 mM; dávkování roztoku heparinu 120 s, dávkování roztoku tetraargininu 3 s, vloženo napětí 30 kV po dobu 30 s, heparin se standardním přídatkem, v základním elektrolytu hydroxyethylcelulosa 0,1 %.

Tabulka 6: Přehled pracovních parametrů metody vypočítaných na základně kalibrační závislosti z obr. 17

| LOD [µg/ml] | LOQ [µg/ml] | % RSD pro 2 µg/ml | % RSD pro 15 µg/ml |
|----------------|----------------|----------------------|-----------------------|
| 1,1 | 3,8 | 4,4 | 6,8 |

Mez detekce je definována jako koncentrace analytu, kdy je již se statistickou jistotou vyvolána změna signálu rozpoznatelná od změn signálu jinými vlivy⁵⁸. Obecně je mez detekce taková koncentrace analytu, která vyvolá trojnásobně větší odezvu, než je šum signálu (pozadí). Počítá se jako průměrná hodnota signálu vícenásobného měření slepého vzorku plus trojnásobek odhadu směrodatné odchylky. Pro účely této metody ovšem není tento výpočet příliš vhodný – nulová hodnota, tedy slepý pokus, vyvolává nejvyšší odezvu detektoru, protože jde o metodu nepřímého stanovení. Nelze tedy příliš jednoznačně určit velikost šumu a poté vypočítat mez detekce výše uvedeným způsobem. Byla proto použita metoda, která využívá veškerá naměřená data, nikoliv jen hodnoty získané měřením slepého pokusu.

Metoda spočívá v analýze rozptylu dat kalibrační závislosti. Kalibrační závislost je popsána rovnicí regresní přímky, kterou jsou proloženy naměřené hodnoty:

$$y = kx + q$$

$$y = -7,61x + 210,23$$

kde y je závisle proměnná a x nezávisle proměnná. Byly spočítány směrnice přímky (k) a úsek přímky (q) a směrodatná odchylka ($s_{x,y}$) rozptylu bodů kolem regresní přímky. Hodnoty lze spočítat pomocí programu MS Excel. Vzorec pro výpočet směrodatné odchylky $s_{x,y}$ je:

$$s_{x,y} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - Y_i)^2}{n - 2}}$$

kde y_i jsou skutečně naměřené hodnoty, Y_i jsou z regresní přímky vypočítané hodnoty odpovídající příslušným x_i a n je počet provedených měření. Po výpočtu $s_{x,y}$ se trojnásobek této hodnoty odečte od úseku q , který zaujímá kalibrační přímka na ose y . Tím se získá úsek q_B a tato hodnota se opět dosadí do rovnice regresní přímky – spočítá se odpovídající x_B , což představuje hodnotu meze detekce (LOD). Tento výpočet můžeme zjednodušit a vyjádřit vzorcem:

$$LOD = \frac{-3 \cdot s_{x,y}}{k}$$

Tentýž výpočet posloužil i pro určení meze stanovitelnosti (LOQ), a to s tím rozdílem, že není uvažován trojnásobek směrodatné odchylky rozptylu bodů kolem kalibrační přímky, ale desetinásobek:

$$LOQ = \frac{-10 \cdot s_{x,y}}{k}$$

Vypočítaná mez detekce činí 1,1 µg/ml heparinu v roztoku a mez stanovitelnosti 3,8 µg/ml heparinu v roztoku. Oba tyto parametry jsou použitelné pro stanovení heparinu, ovšem ještě je třeba vyzkoušet možnosti, které by vedly k dalšímu snížení LOD i LOQ – v případě stanovení heparinu v krvi či plasmě by byly pro nižší hladiny heparinu ve vzorku nedostatečné.

4.10 Stabilita tetraargininu

Během počátečních měření byl pozorován nezvyklý nárůst ploch píků tetraargininu při opakovaném použití jeho roztoku. Roztok, jež byl používán ve všech experimentech, měl koncentraci 1 mg/ml tetraargininu v příslušném základním elektrolytu (obvykle v 10 mM kyselině fosforečné). Připravován byl ředěním vodného roztoku tetraargininu o koncentraci 10 mg/ml. Všechny roztoky byly stejně jako pevný tetraarginin skladovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (jak doporučuje výrobce).

Byl proveden experiment za účelem ověření vhodnosti tohoto skladování – byly připraveny vzorky tetraargininu o koncentraci 10 mg/ml ve vodě a 1 mg/ml v kyselině fosforečné. Každý ze vzorků byl poté třikrát proměřen za těchto podmínek: základní elektrolyt 10 mM kyseliny fosforečné; dávkován vzorek tlakem 5 kPa po dobu 3 s; vloženo napětí 30 kV po dobu 30 s a zóna byla mobilizována skrz detektor tlakem 5 kPa. Vzorky byly poté několik dní skladovány při laboratorní teplotě, při $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Poté byly vzorky bez promíchávání vytemperovány na laboratorní teplotu a stejným způsobem zaznamenány jejich elektroferogramy. Roztoky vzorků byly poté důkladně promíchány a opět proměřeny. S vybranými vzorky byl stejný postup opakován i po několikátýdenním skladování.

V tabulce 7 jsou zaznamenány průměrné plochy získaných píků a jejich procentuální vyjádření vzhledem k původně naměřené ploše píku daného vzorku.

Naměřené hodnoty ukazují, že skladování roztoku tetraargininu při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ mělo na roztok značný vliv – naměřené hodnoty při opakovaném zmražení vzrostly až na 450 % původní průměrné plochy píku, a to jen v případě roztoku o koncentraci 1 mg/ml v kyselině fosforečné. Při následném promíchání tohoto roztoku nebyly naměřeny hodnoty nižší, než 120 % původních hodnot.

Ve vodném roztoku o koncentraci 10 mg/ml takto výrazná změna nebyla zaznamenána – naměřené hodnoty (roztoku skladovaného při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) narostly na 150 % původní plochy a po promíchání klesly téměř na původní hodnoty. U roztoku o koncentraci 10 mg/ml je také třeba brát v úvahu, že je roztok pro tuto metodu příliš koncentrovaný, tudíž částečně dochází k předávkování detektoru – naměřené hodnoty mají vyšší směrodatnou odchylku a měření bylo spíše orientačního charakteru.

Roztoky skladované při laboratorní teplotě nebo v $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ tento jev nárůstu ploch

nevykazovaly – po jejich opakovaném proměření byla průměrná plocha o něco vyšší, ale nikoliv v takové míře, jako u $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Navýšení plochy bylo u těchto vzorků zaznamenáno po promíchání, ovšem při dalším skladování a opakovaném měření se již plocha píku dále neměnila ani po několika týdnech.

Tento jev je možné vysvětlit jak fyzikálně-chemickými vlivy, tak mechanickým působením na vzorek. Tímto mechanickým působením může být právě míchání vzorku, kdy je promícháván malý objem vzorku (0,1 ml). Může dojít k nerovnoměrnému promísení, případně k ulpění malé části roztoku na stěnách vialky. Není vyloučeno ani malé odpaření roztoku vzorku, i když byly vialky utěsněny.

Nezanedbatelný vliv zde má fakt, že fosfátové ionty z kyseliny fosforečné mohou tvořit s tetraargininem nekovalentní vazby⁵⁹. Tyto vazby se tvoří mezi fosfáty, sulfáty a karboxyly a guanidinovou skupinou argininu, která je silně bazická – arginin je považován za nejvíce nukleofilní přírodní aminokyselinu, následován lysinem a histidinem. Tyto interakce argininu jsou závislé kromě jiného na jeho prostorovém uspořádání, pH roztoku nebo na sousedních skupinách v peptidu. Zmraznutím roztoku může dojít ke vzniku nových interakcí. Tímto pak dochází k výrazně odlišným výsledkům mezi roztokem tetraargininu v kyselině fosforečné skladovaném při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a skladovaném při teplotách nad $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, i když nekovalentní interakce mezi guanidinovou skupinou tetraargininu a fosfáty pravděpodobně vznikají ve všech těchto roztocích s kyselinou fosforečnou.

Je tedy nutné před každým měřením připravovat nový roztok tetraargininu v kyselině fosforečné, pokud toto není možné, je nutné tento roztok neskladovat při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, ale při laboratorní teplotě nebo $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ pečlivě uzavřený. Pro pevný tetraarginin je ovšem nutné stále dodržovat pokyny výrobce, a to skladovat při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabulka 7: Vliv způsobu skladování roztoku TA na plochu píku

| Vzorek tetraargininu | Podmínky skladování | Doba skladování (počet dnů) | Promíchání roztoku | % původní plochy píku |
|------------------------------|---------------------|-----------------------------|--------------------|-----------------------|
| 10 mg/ml vodný roztok | laboratorní teplota | 0 | - | 100,0 |
| | | 5 | - | 105,8 |
| | | 5 | promícháno | 115,6 |
| 10 mg/ml vodný roztok | 5 °C | 0 | - | 100,0 |
| | | 5 | - | 110,1 |
| | | 5 | promícháno | 111,4 |
| 10 mg/ml vodný roztok | -20 °C | 0 | - | 100,0 |
| | | 5 | - | 150,3 |
| | | 5 | promícháno | 110,8 |
| 1 mg/ml v 10mM k. fosforečné | laboratorní teplota | 0 | - | 100,0 |
| | | 5 | - | 97,5 |
| | | 5 | promícháno | 128,2 |
| | | 70 | - | 130,4 |
| | | 70 | promícháno | 126,0 |
| 1 mg/ml v 10mM k. fosforečné | 5 °C | 0 | - | 100,0 |
| | | 5 | - | 96,8 |
| | | 5 | promícháno | 121,0 |
| | | 70 | - | 123,7 |
| | | 70 | promícháno | 115,7 |
| 1 mg/ml v 10mM k. fosforečné | -20 °C | 0 | - | 100,0 |
| | | 5 | - | 244,1 |
| | | 5 | promícháno | 128,8 |
| | | 70 | - | 459,0 |
| | | 70 | promícháno | 124,4 |

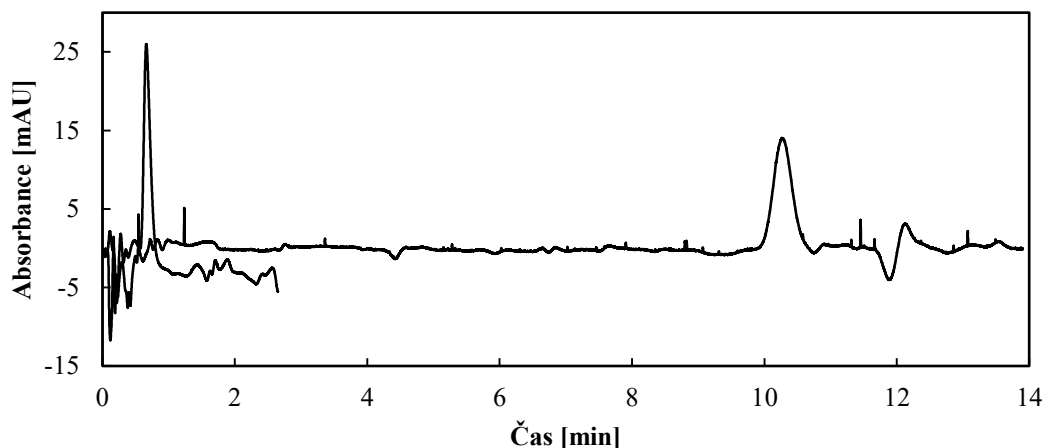
4.11 Možnost zkrácení doby analýzy

Na závěr byla zkoumána možnost zkrácení doby analýzy prostým zkrácením separační kapiláry. Vzhledem ke konstrukčnímu uspořádání kazety, do které se kapilára vkládá, bylo možné kapiláru zkrátit maximálně na 30,0 cm celkové délky (21,5 cm efektivní délky).

V takto upravené kapiláře byl proměřen roztok tetraargininu: základní elektrolyt 10 mM kyselina fosforečná, bez heparinu, v základním elektrolytu 0,1 % hydroxyethylcelulosy. Do kapiláry byl tlakem 5 kPa po dobu 3 s nadávkován roztok tetraargininu, poté bylo na kapiláru vloženo napětí 30 kV po dobu 30 s. Vzniklé zóny byly mobilizovány tlakem skrz detektor ven z kapiláry.

Na obr. 18 je vidět porovnání získaných elektroferogramů – záznam z původní kapiláry ukazuje pík přibližně v 11. minutě s plochou 164,1 mAU·s, záznam ze zkrácené kapiláry poskytuje ostrý pík před 1. minutou s plochou 179,8 mAU·s, avšak je zde i značný šum základní linie.

Toto měření nebylo dále rozvíjeno, sloužilo jen jako námět jedné z možností, jak by se dalo zkracovat čas analýzy.



Obr. 18: Elektroferogramy tetraargininu ve zkrácené (délka 30 cm, pík vlevo) a původní (délka 50 cm, pík vpravo) kapiláře. Roztok tetraargininu byl nadávkován po dobu 3 s tlakem 5 kPa, poté bylo na kapiláru vloženo napětí 30 kV po dobu 30 s a zóny mobilizovány tlakem. Základní elektrolyt – 10 mM kyselina fosforečná.

Přibližně desetinásobné zkrácení analýzy se ovšem jevílo jako nepravděpodobné – bylo proto provedeno další měření za účelem určení pozorované a efektivní mobility tetraargininu a elektroosmotického toku, aby se ověřilo, zdali je takové zkrácení času analýzy skutečně možné a zdali pík objevující se v 1. minutě patří tetraargininu.

Bylo provedeno měření s markerem elektroosmotického toku. Jako tento marker byl použit roztok thiomocoviny o koncentraci 0,1 mg/ml. Následující měření byla provedena v základním elektrolytu 10 mM kyselině fosforečné a v základním elektrolytu 10 mM kyselině fosforečné s 0,1 % hydroxyethylcelulosity. Měření byla provedena vždy třikrát.

Za účelem určení velikosti elektroosmotického toku byla do kapiláry nadávkována první zóna roztoku tlakem 5 kPa po dobu 3s, poté byla zóna mobilizována tlakem 5 kPa po dobu jedné minuty. Stejným způsobem byla nadávkována a mobilizována druhá zóna směsi. Poté bylo na kapiláru vloženo napětí 30 kV po dobu 120 s. Jako poslední byla nadávkována třetí zóna směsi tlakem 5 kPa po dobu 3 s a zóny byly mobilizovány tlakem 5 kPa skrz detektor ven z kapiláry.

Pro výpočet efektivní a pozorované mobility tetraargininu byl roztok tetraargininu o koncentraci 1 mg/ml nadávkován do kapiláry tlakem 5 kPa po dobu 3 s a na kapiláru bylo vloženo napětí 30 kV až do konce analýzy.

Ze základních teoretických vztahů byly odvozeny následující vzorce pro výpočty:

$$\mu_{EOF} = \frac{[(t_3 - t_2) - (t_2 - t_1)] \cdot l_c \cdot l_D}{t_3 \cdot t_U \cdot U}$$

kde μ_{EOF} je mobilita elektroosmotického toku, l_D efektivní délka kapiláry, l_c celková délka kapiláry, t_1, t_2, t_3 migrační časy příslušné zóny thiomocoviny (markeru), U vkládané napětí a t_U doba vkládání napětí.

$$\mu_{poz} = \frac{l_c \cdot l_D}{t_{mig} \cdot U}$$

kde μ_{poz} je pozorovaná mobilita tetraargininu a t_{mig} je migrační čas tetraargininu.

$$\mu_{ef} = \mu_{poz} - \mu_{EOF}$$

kde μ_{ef} je efektivní mobilita tetraargininu.

Z elektroferogramů byly odečteny migrační časy sledovaných píků tetraargininu nebo thiomocoviny a z těchto časů byly spočítány mobility a elektroosmotický tok

pomocí výše uvedených vzorců. Vypočítané hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 8.

Z uvedených mobilit je jasné, že už tak velmi nízký elektroosmotický tok byl potlačen přidávkem hydroxyethylcelulosy v podstatě na nulu. V případě základního elektrolytu s hydroxyethylcelulosou tím pádem přestává být rozdíl mezi pozorovanou a efektivní mobilitou tetraargininu. Tento rozdíl způsobuje právě elektroosmotický tok. V případě elektrolytu bez hydroxyethylcelulosy jsou mobility odlišné, tudíž elektroosmotický tok zde k pozorované mobilitě tetraargininu přispívá.

Tabulka 8: Přehled vypočítaných hodnot mobility elektroosmotického toku, pozorované a efektivní mobility tetraargininu

| | Elektroosmotický tok (SD) [$\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$] | Pozorovaná mobilita TA (SD) [$\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$] | Efektivní mobilita TA (SD) [$\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$] |
|-----|--|--|---|
| - | $4,01 \cdot 10^{-5}$ ($0,68 \cdot 10^{-5}$) | $5,72 \cdot 10^{-4}$ ($0,02 \cdot 10^{-4}$) | $5,32 \cdot 10^{-4}$ ($0,05 \cdot 10^{-4}$) |
| HEC | $-0,05 \cdot 10^{-7}$ ($9,70 \cdot 10^{-7}$) | $5,00 \cdot 10^{-4}$ ($0,00 \cdot 10^{-4}$) | $5,00 \cdot 10^{-4}$ ($0,00 \cdot 10^{-4}$) |

Na základě vypočítaných hodnot mobilit a elektroosmotického toku byly odhadnuty délky dávkovaných zón a časy potřebné pro průchod kapilárou. Pokud v dlouhé kapiláře (50,0 cm) s hydroxyethylcelulosou v BGE dávkujeme zónu heparinu po dobu 120 s tlakem 5 kPa, tato zóna v kapiláře zaujímá přibližně 5,0 cm. Tato hodnota byla odhadnuta na základě migračního času třetí zóny thiomocoviny z výše popsaného měření za účelem výpočtu elektroosmotického toku. Migrační čas třetí zóny thiomocoviny byl 1000 s – znamená to, že za 1000 s vlivem tlaku 5 kPa zóna projde 41,5 cm (efektivní délka kapiláry) – rychlost zón v kapiláře způsobená jen tlakem je tedy 0,0415 cm/s a proto zóna heparinu dávkovaná 120 s má délku přibližně 5,0 cm. Poté je třeba uvažovat, jakou rychlostí zóna tetraargininu migruje vlivem vkládání napětí – tato rychlost je přímo úměrná jeho mobilitě, vkládanému napětí a nepřímo úměrná celkové délce kapiláry. Po dosazení hodnot do vztahu:

$$v_{TA} = \mu_{poz} \cdot \frac{U}{l_c}$$

kde v_{TA} je rychlost tetraargininu, μ_{poz} je pozorovaná mobilita tetraargininu, U velikost vkládaného napětí a l_c celková délka kapiláry, dostaneme hodnotu 0,30 cm/s.

Vkládáme-li napětí na kapiláru 30 s, musí teoreticky zóna tetraargininu migrovat 9,0 cm. Je tedy jasné, že zóny heparinu (délka 5,0 cm, migruje nespecifikovanou rychlostí k anodě) projdou se zónou tetraargininu (migruje 9,0 cm ke katodě) zcela skrz sebe. Pokud předpokládáme, že se námi sledovaný zbylý tetraarginin nachází po vkládání napětí ve vzdálenosti 9,0 cm od začátku kapiláry, při rychlosti pohybu způsobeného tlakem (0,0415 cm/s) by se tato zóna měla objevit na elektroferogramu přibližně ve 13. minutě analýzy (naměřená hodnota je po 10. minutě, viz obr. 18).

Stejnou úvahu můžeme aplikovat na odhad pohybu a délky zón v kapiláře o délce 30,0 cm (efektivní délka 21,5 cm). Rychlost migrace zón způsobená pouze tlakem je teoreticky přímo úměrná délce kapiláry (v kratší kapiláře je nižší odpor kapaliny), tedy teoreticky se zóny pohybují rychlostí 0,069 cm/s (délka dávkované zóny heparinu je pak cca 8,3 cm). Po dosazení do vzorce na výpočet rychlosti migrace tetraargininu způsobené vkládáním napětí dostaneme rychlost 0,50 cm/s. Při vkládání napětí 30 s tedy tetraarginin migruje 15 cm skrz kapiláru ke katodě, poté rychlostí 0,069 cm/s migruje k detektoru (což činí vzdálenost 6,5 cm), pík lze tedy očekávat přibližně při 1,5. minutě (naměřená hodnota je 1. minuta, viz obr. 18).

Z této úvahy plyne, že zdánlivě špatně identifikovaný pík po zkrácení kapiláry skutečně patří tetraargininu a zmenšení délky kapiláry o 40 % může způsobit zkrácení analýzy o více než 90 %. Při dalších pokusech o zkrácení analýzy je proto nutné optimalizovat délku kapiláry velmi citlivě.

5 Závěr

Bylo zpracováno shrnutí v praxi používaných metod stanovení heparinu a jejich porovnání z hlediska jejich efektivity, přičemž bylo zjištěno, že problematikou stanovení heparinu se zabývá mnoho vědeckých prací, ale žádná z nových metod nebyla aplikována do běžné praxe. Téměř všechny tyto metody jsou použity s větším úspěchem ke stanovení heparinu v přípravcích, než v biologických vzorcích – pokud jde o biologické vzorky, problémem je složitá matrice a nemožnost stanovovat heparin přímo. Všechny nové metody, až na pár specifických výjimek, využívají nepřímé detekce pomocí nejrozličnějších markerů, které s heparinem tvoří komplex.

Stejně tak tomu bylo i v této práci, avšak zde byl jako tento marker použit peptid tetraarginin, který byl vybrán na základě složení přirozeného antidota heparinu – protaminu. Tetraarginin je přesně definovaný a jednoduchý peptid, který absorbuje při 200 nm a s heparinem tvoří stabilní komplex. Na základě této vlastnosti byl sledován úbytek plochy píku tetraargininu v závislosti na obsahu heparinu v roztoku.

Jako základní elektrolyt byla zvolena 10 mM kyselina fosforečná, přičemž bylo porovnáno více koncentrací a kyselina chloroctová, kdy byl na elektroferogramech znatelný vyšší šum základní linie a přehřívání kapiláry vlivem vznikajícího Joulova tepla.

Původní experimentální uspořádání spočívalo v přidávání heparinu do celého objemu základního roztoku, což sloužilo jen pro účely definování základních parametrů (zákl. elektrolytu a vkládání napětí). Toto uspořádání by v praxi bylo nevhodné, ne-li neproveditelné. Proto byla další měření prováděna s použitím dávkování jednotlivých zón do kapiláry – negativně nabitý heparin byl dávkován jako první a jako výrazně delší zóna (jde o řádově méně koncentrovaný roztok) a ihned poté byla dávkována krátká zóna kladně nabitého tetraargininu. Poté bylo na kapiláru vloženo napětí a zóny po tuto dobu migrovaly přes sebe, což zajistilo vznik komplexu heparin-tetraarginin. Tento komplex není zcela jednoznačně definován, ale s jistotou lze říci, že nemá takovou mobilitu jako samotný tetraarginin a ani nemá stejné spektrometrické vlastnosti. Zbylý, nevázaný tetraarginin byl zaznamenáván jako pík na elektroferogramu při 200 nm a úbytek jeho plochy byl sledován přímo úměrný koncentraci heparinu v kalibračních roztocích.

Pro vylepšení citlivosti metody a směrodatných odchylek měření bylo zkoušeno přidání známého množství zásobního roztoku heparinu do kalibračních roztoků pro

zvýšení odezvy detektoru nebo potažení stěny kapiláry hydroxyethylcelulosou, která potlačuje elektroosmotický tok.

Metoda byla optimalizována v rozmezí 0 až 20 $\mu\text{g/ml}$, přičemž bylo dosaženo LOD 1,1 $\mu\text{g/ml}$ a LOQ 3,8 $\mu\text{g/ml}$. Byla také zkoumána možnost zkrácení doby analýzy prostřednictvím zkrácení délky separační kapiláry. Ukázalo se, že zkrácení kapiláry o 40 % přináší zkrácení doby analýzy o více než 90 % a při využití tohoto přístupu ke zkracování analýzy musí být délka kapiláry pečlivě optimalizována. V rámci měření byl zjištěn vliv způsobu skladování roztoku tetraargininu na jeho stabilitu a navrženo opatření, aby nedocházelo ke zkreslení výsledků vlivem nestability tohoto roztoku.

Práce na téma stanovení heparinu nabízejí mnoho variant, kam je možno další výzkum orientovat – tato práce nabízí další směry, kde je možné experimentovat – například v délce kapiláry, dávkování z kratšího konce kapiláry nebo přidávání polymerů do základního elektrolytu. Obecně pro všechny metody je vize instrumentální řešení pro on-line analýzu, případně miniaturizace. V neposlední řadě bude nutné vyzkoušet optimalizovat předúpravu vzorku pro elektroforetickou separaci, jelikož metoda by měla být použitelná v reálných vzorcích – těmito jsou vzorky plasmy nebo plné krve pacientů, což je složitá matrice a předúprava bude nevyhnutelná.

6 Literatura

- (1) Wardrop, D.; Keeling, D. *British Journal of Haematology* **2008**, *141*, 757 - 763.
- (2) Mulloy, B.; Hogwood, J.; Gray, E.; Lever, R.; Page, C. P. *Pharmacological Reviews* **2016**, *68*, 76-141.
- (3) Mueller, R. L.; Scheidt, S. *Circulation* **1994**, *89*, 432-449.
- (4) McLean, J. *Circulation* **1959**, *19*, 75-78.
- (5) Marcum, J. A. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences* **2000**, *55*, 37-66.
- (6) Barrit, D. W.; Jordan, S. C. *The Lancet* **1960**, 1309 - 1312.
- (7) Ministerstvo zdravotnictví ČR, *Český lékopis 2009 - Doplněk 2015*; Grada Publishing, a.s., 2015.
- (8) Wishart, D. S.; Feunang, Y. D.; Guo, A. C.; Lo, E. J.; Marcu, A.; Grant, J. R.; Sajed, T.; Johnson, D.; Li, C.; Sayeeda, Z.; Assempour, N.; Iynkkaran, I.; Liu, Y. F.; Maciejewski, A.; Gale, N.; Wilson, A.; Chin, L.; Cummings, R.; Le, D.; Pon, A., et al. *Nucleic Acids Research* **2018**, *46*, D1074-D1082.
- (9) Lüllmann, H.; Mohr, K.; Hein, L. *Barevný atlas farmakologie*; Grada Publ., 2007.
- (10) Glick, D. *Methods of Biochemical Analysis*; Wiley, 2009.
- (11) Jílek, P. *Imunologie: stručně, jasně, přehledně*; Grada, 2014, p 85-86.
- (12) Herman J.; Musil D. a kolektiv. *Žilní onemocnění v klinické praxi*, Grada Publishing a.s., 2011, p 280.
- (13) Lüllmann, H.; Mohr, K.; Wehling, M. *Farmakologie a toxikologie: 47 tabulek*; Grada Publ., 2004.
- (14) Marek, J.; kolektiv. *Farmakoterapie vnitřních nemocí - 4. zcela přepracované a doplněné vydání*; Grada, 2010.
- (15) International Technidyne Corporation, *HEMOCHRON® Jr. Signature+ Whole Blood Microcoagulation Systems: Microkoagulační systém plné krve* p 56.
- (16) International Technidyne Corporation, *Hemochron Response Whole Blood Coagulation System Operator's Manual*, p 47.
- (17) Sobotka, P.; kolektiv. *Patologická fyziologie*; Karolinum, 2013, p 110.
- (18) Jabor, A.; kolektiv. *Vnitřní prostředí*; Grada, 2008, p 530.
- (19) Pecka, M. *Laboratorní hematologie v přehledu - fyziologie a patologie hemostázy*: Praha, 2004, p 237.

- (20) Štern, P.; kolektiv. *Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi*; SEKK s. r. o., 2014.
- (21) Malý M.; Pecka, M.; Dulíček, M.; Blažek, M. *Intervenční a akutní kardiologie* **2006**, *4*, 90-92.
- (22) BioVision. *QuickDetect™ Heparin (Human) ELISA Kit*, 2.
- (23) Luo, H. Q.; Liu, S. P.; Liu, Z. F.; Liu, Q.; Li, N. B. *Analytica Chimica Acta* **2001**, *449*, 261-270.
- (24) Wu, L. P.; Huang, C. Z.; Yang, X.; He, J.; Li, L. L.; Liu, H.; Zhao, H. W. *Analytical Methods* **2013**, *5*, 2511-2514.
- (25) Huang, C. Z.; Pang, X. B.; Li, Y. F. *Analytical Letters* **2005**, *38*, 317-330.
- (26) Zhang, S. Z.; Zhao, F. L.; Li, N.; Li, K.; Tong, S. Y. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2002**, *58*, 2613-2619.
- (27) Sun, W.; Ding, Y. Q.; Rao, J.; Jiao, K. *Spectroscopy and Spectral Analysis* **2006**, *26*, 1322-1325.
- (28) Sun, W.; Jiao, K.; Niu, X. L.; Lu, L. D. *Spectroscopy and Spectral Analysis* **2005**, *25*, 1322-1324.
- (29) Faham, R.; Samadi, A.; Abolhasani, J. *Journal of Applied Spectroscopy* **2017**, *84*, 425-430.
- (30) Patil, S. R.; Mote, U. S.; Kolekar, G. B. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2009**, *30*, 3034-3038.
- (31) Zhu, X. J.; Wang, X. L.; Jiang, C. Q. *Analytical Biochemistry* **2005**, *341*, 299-307.
- (32) Egawa, Y.; Hayashida, R.; Seki, T.; Anzai, J. *Talanta* **2008**, *76*, 736-741.
- (33) Zheng, J.; Ye, T.; Chen, J. Y.; Xu, L.; Ji, X. H.; Yang, C. L.; He, Z. K. *Biosensors & Bioelectronics* **2017**, *90*, 245-250.
- (34) Liu, J. S.; Liu, G. N.; Liu, W. X.; Wang, Y. R. *Biosensors & Bioelectronics* **2015**, *64*, 300-305.
- (35) Mikuš, P.; Valášková, I.; Havránek, E. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2004**, *36*, 441-446.
- (36) Tůma, P.; Samcová, E.; Opekar, F.; Štulík, K. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **2008**, *73*, 187-200.
- (37) Tan, L.; Yao, S. Z.; Xie, Q. J. *Talanta* **2007**, *71*, 827-832.
- (38) Niu, X.; Zhang, W.; Zhao, N.; Sun, W. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*

2008, 22, 165-172.

- (39) Chen, Y.; Ding, J. W.; Qin, W. *Analyst* **2012**, 137, 1944-1949.
- (40) Lei, J. H.; Ding, J. W.; Chen, Y.; Qin, W. *Analytica Chimica Acta* **2015**, 858, 60-65.
- (41) Abramova, N.; Bratov, A. *Electroanalysis* **2015**, 27, 663-669.
- (42) Li, L. F.; Liang, Y. Z.; Liu, Y. C. *Analytical Biochemistry* **2013**, 434, 242-246.
- (43) Cheng, T. J.; Lin, T. M.; Wu, T. H.; Chang, H. C. *Analytica Chimica Acta* **2001**, 432, 101-111.
- (44) Liao, Q. G.; Li, W. H.; Luo, L. G. *Chromatographia* **2013**, 76, 1677-1682.
- (45) Matanovic, M. R.; Grabnar, I.; Grabnar, P. A.; Roskar, R. *Acta Pharmaceutica* **2015**, 65, 43-52.
- (46) Galeotti, F.; Volpi, N. *Analytical Chemistry* **2011**, 83, 6770-6777.
- (47) Toyoda, H.; Nagashima, T.; Hirata, R.; Toida, T.; Imanari, T. *Journal of Chromatography B* **1997**, 704, 19-24.
- (48) Zhao, T.; Song, X. L.; Tan, X. Q.; Xu, L. H.; Yu, M. X.; Wang, S. Y.; Liu, X. M.; Wang, F. S. *Carbohydrate Polymers* **2016**, 141, 197-203.
- (49) Wielgos, T.; Havel, K.; Ivanova, N.; Weinberger, R. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2009**, 49, 319-326.
- (50) Dimitrellos, V.; Lamari, F. N.; Militopoulou, M.; Kanakis, I.; Karamanos, N. K. *Biomedical Chromatography* **2003**, 17, 42-47.
- (51) Martínková, E. *Study of interaction between protamine and heparin and its applicability in capillary electrophoresis*. Charles University, Prague, 2017.
- (52) Matýšková, M.; Buliková, A. *Vnitřní lékařství* **2006**, 52, 92-97.
- (53) Velick, S. F.; Udenfriend, S. *Journal of Biological Chemistry* **1951**, 191, 233-238.
- (54) Cundall, R. B.; Jones, G. R.; Murray, D. *Die Makromolekulare Chemie* **1982**, 183, 849-861.
- (55) Malý, M.; Křížek, T. *Chromatographia* **2016**, 79, 1643-1648.
- (56) Molnářová, K. *Optimalizácia elektroforetického stanovenia protamínu a inzulínu*. Univerzita Karlova, Praha, 2017.
- (57) Engelberg, H. *Circulation* **1961**, 23, 578.
- (58) Miller, J. N.; Miller, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*; Pearson/Prentice Hall, 2005.
- (59) Schug, K. A.; Lindner, W. *Chemical Reviews* **2005**, 105, 67-113.