

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. Zbýlý 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.