

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



**PROBLEMATIKA STANOVENÍ NEOPTERINU
A KREATININU V MOČI S VYUŽITÍM
VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE
SE ZAMĚŘENÍM NA KLINICKOU PRAXI**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce: doc. RNDr. Lenka Kujovská Krčmová, Ph.D.

Hradec Králové, 2020

Bc. Zdeněk Kepka

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 15. 5. 2020

Zdeněk Kepka

Děkuji doc. RNDr. Lence Kujovské Krčmové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, cenné rady a především čas, který mi během vypracování diplomové práce věnovala. Rád bych také poděkoval Mgr. Kateřině Kučerové za vstřícnost a pomoc při vypracování experimentální části. Dále děkuji své rodině a přátelům za podporu a pochopení, nejen během vypracování této práce, ale po celou dobu studia.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Zdeněk Kepka

Školitel: doc. RNDr. Lenka Kujovská Krčmová, Ph.D.

Název diplomové práce: Problematika stanovení neopterinu a kreatininu v moči s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie se zaměřením na klinickou praxi

Tato diplomová práce se zabývá problematikou stanovení neopterinu a kreatininu ve vzorcích moči metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie. V teoretické části jsou shrnuty informace o stanovovaných látkách a možnostech jejich analýzy. Součástí je také rešerše metod publikovaných v odborné literatuře. Dále je ve zkratce představena metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie včetně typů stacionárních fází a chromatografických principů využitých v experimentální části práce.

V experimentální části práce jsou ověřovány separační vlastnosti šesti chromatografických kolon pro stanovení neopterinu a kreatininu v moči. Kolony byly porovnávány na základě následujících parametrů: opakovatelnost nástřiku, rozlišení, symetrie píků a účinnost kolony. U vybraných kolon bylo částečně optimalizováno složení mobilní fáze. Ve většině případů byl mobilní fází fosfátový pufr o koncentraci $c = 15 \text{ mmol/l}$ a pH 6,5. Detekce kreatininu byla prováděna detektorem s diodovým polem při vlnové délce 235 nm. Neopterin byl detekován fluorescenčním detektorem při excitační vlnové délce 353 nm a emisní vlnové délce 438 nm. Jako nejvhodnější byla vybrána chromatografická kolona YMC Triart C-18, 150 x 4,6 mm, 3 μm . Tato kolona dosáhla uspokojivých výsledků v nejvíce hodnocených parametrech.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Bc. Zdeněk Kepka

Supervisor: Assoc. Prof. RNDr. Lenka Kujovská Krčmová, Ph.D.

Title of the diploma thesis: Difficulty of urinary neopterin and creatinine determination using high-performance liquid chromatography with focus on clinical practice

This diploma thesis deals with the determination of neopterin and creatinine in urine samples by high performance liquid chromatography. The theoretical part summarizes information about the substances and their analysis. It also includes a review of methods published in the literature. The method of high-performance liquid chromatography including types of stationary phases and chromatographic principles used in the experimental part of this work is briefly introduced.

The separation properties of six chromatographic columns for the determination of neopterin and creatinine in urine were verified in the experimental part of the thesis. Columns were compared by the following parameters: repeatability, resolution, peak symmetry, and column efficiency. The composition of the mobile phase was optimized for selected columns. The mobile phase was a phosphate buffer with a concentration of 15 mmol/l and pH 6.5 in most cases. Creatinine detection was performed by a Photodiode Array Detector at 235 nm. Neopterin was detected by a Fluorescent Detector at an excitation wavelength of 353 nm and an emission wavelength of 438 nm. The most suitable was a YMC Triart C-18, 150 x 4.6 mm, 3 μ m chromatographic column. This column achieved satisfactory results in the most evaluated parameters.

OBSAH

| | |
|--|----|
| POUŽITÉ ZKRATKY | 8 |
| 1. ÚVOD | 9 |
| 2. CÍL PRÁCE | 10 |
| 3. TEORETICKÁ ČÁST | 11 |
| 3.1 Neopterin | 12 |
| 3.1.1 Metody stanovení neopterinu | 15 |
| 3.2 Kreatinin | 21 |
| 3.2.1 Metody stanovení kreatininu | 22 |
| 3.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie | 32 |
| 3.3.1 Kapalinový chromatograf | 32 |
| 3.3.2 Chromatografické principy využití v této práci | 33 |
| 3.3.3 Typy stacionárních fází využitých v této práci | 35 |
| 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 41 |
| 4.1 Přístrojové vybavení | 42 |
| 4.2 Chemikálie | 43 |
| 4.3 Standardy | 43 |
| 4.4 Příprava roztoků | 43 |
| 4.4.1 Příprava zásobních roztoků | 43 |
| 4.4.2 Příprava pracovních roztoků | 43 |
| 4.4.3 Příprava mobilních fází | 44 |
| 4.5 Odběr a příprava vzorků | 44 |
| 4.6 Vlastní analýza | 45 |
| 4.7 Parametry použité k vyhodnocení | 46 |
| 4.7.1 Opakovatelnost nástřiku | 46 |
| 4.7.2 Rozlišení | 46 |
| 4.7.3 Symetrie píků | 46 |
| 4.7.4 Účinnost kolony | 47 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5. | VÝSLEDKY A DISKUZE | 48 |
| 5.1 | Výběr separačních podmínek..... | 49 |
| 5.1.1 | Gemini C ₁₈ , 150 x 3,0 mm, 5 μm | 49 |
| 5.1.2 | Kinetex HILIC, 150 x 3,0 mm, 2,6 μm | 53 |
| 5.1.3 | YMC Triart C-18, 150 x 4,6 mm, 3 μm | 54 |
| 5.1.4 | Spojené kolony Chromolith RP-18e, 50 x 4,6 mm a 100 x 3,0 mm..... | 57 |
| 5.1.5 | Chromolith HighResolution RP-18e, 100 x 4,6 mm..... | 59 |
| 5.1.6 | Kinetex Polar C ₁₈ , 100 x 4,6 mm, 2,6 μm | 60 |
| 5.1.7 | Shrnutí..... | 62 |
| 5.2 | Výsledky hodnocených parametrů | 62 |
| 5.2.1 | Opakovatelnost nástřiku | 62 |
| 5.2.2 | Rozlišení | 66 |
| 5.2.3 | Symetrie píků | 67 |
| 5.2.4 | Účinnost kolony..... | 69 |
| 5.2.5 | Shrnutí..... | 70 |
| 6. | ZÁVĚR..... | 72 |
| 7. | POUŽITÁ LITERATURA..... | 73 |

POUŽITÉ ZKRATKY

| | |
|-----------------------|---|
| A_s | Faktor symetrie |
| ELISA | Enzymoimunoanalýza (Enzyme-linked immuno sorbent assay) |
| ESI | Ionizace elektrosprejem (Electrospray ionization) |
| FD | Fluorescenční detektor (Fluorescence detector) |
| FDA | United States Food and Drug Administration |
| GTP | Guanosintrifosfát |
| GTP-CH | Guanosintrifosfát cyklohydroláza I |
| HETP | Výškový ekvivalent teoretického patra (Height equivalent to a theoretical plate) |
| HILIC | Hydrofilní interakční chromatografie (Hydrophilic interaction chromatography) |
| HIV | Virus lidské imunitní nedostatečnosti (Human immunodeficiency virus) |
| HPLC | Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High performance liquid chromatography) |
| MS | Hmotnostní spektrometr (Mass spectrometer) |
| N | Počet teoretických pater |
| NADH/NAD ⁺ | Nikotinamidadenindinukleotid |
| NP | Normální fáze (Normal phase) |
| PDA | Detektor s diodovým polem (Photodiode-array detector) |
| PSP | Povrchově porézní částice (Porous shell particles) |
| RIA | Radioimunoanalýza (Radioimmunoassay) |
| RP | Reverzní fáze (Reversed phase) |
| R_s | Rozlišení |
| RSD | Relativní směrodatná odchylka |
| t_r | Retenční čas |
| UHPLC | Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (Ultra-high performance liquid chromatography) |
| ÚKBD FN HK | Ústav klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové |
| UV | Ultrafialový (Ultraviolet) |

1. ÚVOD

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jednou z metod, která je velmi často využívána analytickými laboratořemi. Velký význam má jak v klinických laboratořích, kde je využívána pro rutinní diagnostiku některých analytů, tak i v laboratořích vědeckých a výzkumných. Mezi hlavní výhody HPLC patří její vysoká separační účinnost, ale také univerzálnost. Pomocí HPLC je možné separovat a následně stanovit širokou škálu analytů v nejrůznějších matricích.

HPLC byla vybrána pracovníky Výzkumné laboratoře Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové jako vhodná pro vývoj metody na současné stanovení neopterinu a kreatininu v moči. Metoda byla vytvořena, validována a několik let prováděna za využití HPLC kolony Gemini C₁₈, 150 x 3,0 mm, 5 μm. Po dlouhodobém výpadku ve výrobě a následném zakoupení nové šarže kolony v roce 2018, došlo k výraznému zhoršení jejích separačních vlastností. I po reklamaci a testování kolony z jiné šarže se nepodařilo dosáhnout původních separačních vlastností, tím vznikl důvod pro zadání této diplomové práce.

2. CÍL PRÁCE

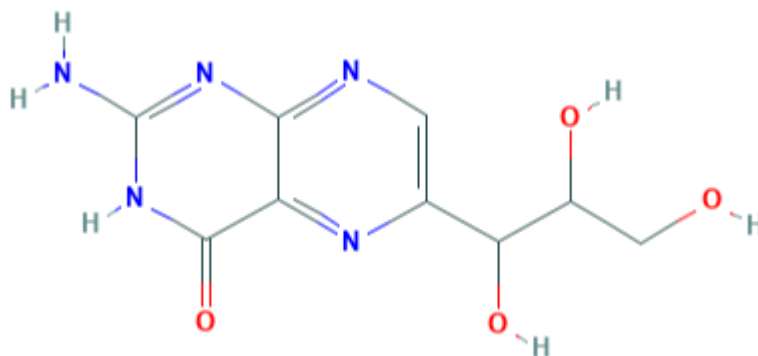
Cílem této práce bylo doporučit chromatografickou kolonu, která bude schopna spolehlivě zajistit stanovení neopterinu a kreatininu v moči pro klinickou praxi. Během vypracování práce bylo vyzkoušeno šest různých analytických kolon. Analýza byla prováděna nejen s využitím standardů stanovovaných látek ale i reálných vzorků moči. Tím byl ověřen vliv biologické matrice a v ní obsažených balastních látek na průběh analýzy. Vhodná kolona byla vybrána na základě provedeného měření a porovnáním parametrů testu vhodnosti chromatografického systému.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Neopterin

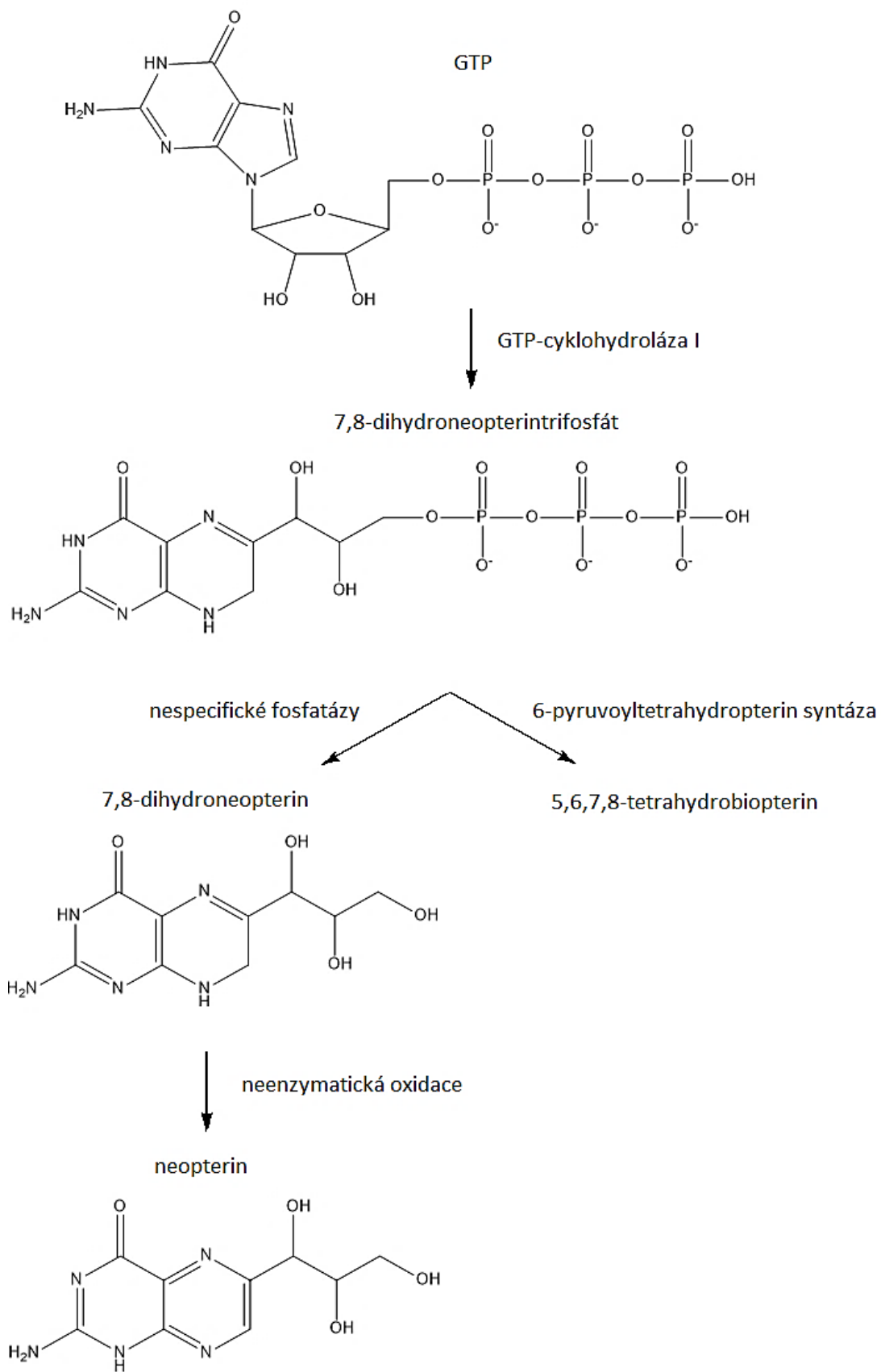
Byl objeven Remboldem a Buschmannem roku 1963 v larvách včelích dělnic. Po čtyřech letech od jeho objevu byl izolován z lidské moči. Dalším zkoumáním bylo zjištěno, že zvýšené hladiny se nacházejí u pacientů s maligním onemocněním a u pacientů s virovou infekcí. Předpokládalo se, že zvýšená hladina má souvislost s imunitní odpovědí pacientů namířenou proti nádorovým, nebo virem infikovaným buňkám. V roce 1984 bylo prokázáno, že lidské makrofágy in vitro produkují neopterin, pokud jsou stimulovány interferonem γ . Od této doby výzkumy prováděné in vivo i in vitro prokázaly, že syntéza neopterinu je úzce spojena s aktivací buněčného imunitního systému [1].

Systematický název je 2-amino-6-[(1S,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl]-1H-pteridin-4-on. Jeho struktura vychází z pteridinu (pyrazino-[2,3-d]-pyrimidinu). Vzorec je zobrazen na obrázku číslo 1. Molekulová hmotnost je 253,22 g/mol. Je fotosenzitivní, na světle dochází k rozkladu na deriváty pteridinu. Vyskytuje se ve formě dvou izomerů D- a L-. D-neopterin je znakem aktivace buněčného imunitního systému. Má tři oxidační formy, redukovaný tetrahydroneopterin, částečně oxidovaný dihydroneopterin, nebo zcela oxidovaný neopterin. Pouze zcela oxidovaný neopterin je schopný fluorescence [2].



Obrázek 1: Vzorec neopterinu [2]

Neopterin je tvořen makrofágy a dendritickými buňkami po jejich stimulaci interferonem γ ale i dalšími produkty aktivovaných T lymfocytů. Syntéza neopterinu je uvedena na obrázku číslo 2. Jejím prvním krokem je hydrolytické štěpení guanosintrifosfátu (GTP) na 7,8-dihydroneopterintrifosfát, tato reakce je katalyzována enzymem GTP-cyklohydroláza I (GTP-CH). Fosfáty jsou poté z molekuly, odstraněny působením nescifických fosfatáz. Vzniklý 7,8-dihydroneopterin je oxidací přeměňován na neopterin. 7,8-dihydroneopterintrifosfát je také prekurzorem pro tvorbu tetrahydrobiopterinu, biopterinu a dalších pteridinů. Prozánětlivé cytokiny stimulují tvorbu neopterinu zvýšenou syntézou GTP-CH [3].



Obrázek 2: Syntéza neopterinu

Měření koncentrace neopterinu v moči, krvi a mozkomíšním moku poskytuje informaci o aktivaci imunitní reakce odvozené od T-pomocných lymfocytů. Vysoké hladiny jsou také spojeny se zvýšenou produkcí reaktivních forem kyslíku, díky tomu je možné neopterin považovat za indikátor oxidačního stresu vznikajícího v důsledku aktivace imunity [4].

Ke zvýšení koncentrace neopterinu v tělních tekutinách dochází při bakteriálních a virových infekcích (včetně HIV). Akutní fáze virových infekcí je doprovázena jeho vysokými hladinami. Akutní fáze bakteriálních infekcí je spojena s nízkými hladinami, ale při přechodu do chronicity se koncentrace zvyšují. Zvýšená koncentrace má souvislost s dalšími zánětlivými onemocněními, autoimunitními chorobami a neurodegenerativními chorobami. Zvýšené koncentrace v krvi byly popsány také ve vyšším věku a pravděpodobně souvisejí s chronickými poruchami vznikajícími při stárnutí, včetně metabolického syndromu a kardiovaskulárních chorob [3][4].

Měření koncentrace neopterinu v tělních tekutinách je v klinické praxi využíváno zejména ke včasné diagnostice infekcí, především virové etiologie. Vyšetření je také používáno k monitorování průběhu terapie HIV pozitivních pacientů nebo pacientů podstupujících imunomodulační terapii. Vyšetření je možné využít i v dalších oblastech medicíny například v gastroenterologii, revmatologii, onkologii, transfuziologii nebo při transplantacích [3].

Výrobci komerčních souprav pro stanovení neopterinu stále doporučují využívat normální hodnoty, které v roce 1992 publikoval Wachter. Součástí doporučení je ale také informace, že je vhodné, aby si každá laboratoř tyto hodnoty ověřila a případně upravila. Normální hodnoty v séru jsou vedeny v tabulce číslo 1 a v moči v tabulce číslo 2 [1][5].

Tabulka 1: Normální hodnoty neopterinu v séru [1]

| věk [roky] | pohlaví | střední hodnota [nmol/l] | horní hranice normálních hodnot [nmol/l] |
|------------|------------|--------------------------|--|
| 0 – 18 | muži, ženy | 267 | 432 |
| 18 – 75 | muži, ženy | 226 | 405 |
| > 75 | muži, ženy | 181 | 374 |

Tabulka 2: Normální hodnoty neopterinu v moči [1]

| věk [roky] | pohlaví | střední hodnota [$\mu\text{mol/mol}$ kreatininu] | horní hranice normálních hodnot [$\mu\text{mol/mol}$ kreatininu] |
|------------|------------|--|---|
| 1 – 4 | muži, ženy | 267 | 432 |
| 4 – 7 | muži, ženy | 226 | 405 |
| 7 – 12 | muži, ženy | 181 | 374 |
| 12 – 15 | muži, ženy | 171 | 343 |
| 15 – 18 | muži, ženy | 144 | 320 |
| 18 – 25 | muži | 123 | 195 |
| | ženy | 128 | 208 |
| 26 – 35 | muži | 101 | 182 |
| | ženy | 124 | 209 |
| 36 – 45 | muži | 109 | 176 |
| | ženy | 140 | 239 |
| 46 – 55 | muži | 105 | 197 |
| | ženy | 147 | 229 |
| 56 – 65 | muži | 119 | 218 |
| | ženy | 156 | 249 |
| > 65 | muži | 133 | 229 |
| | ženy | 151 | 251 |

3.1.1 Metody stanovení neopterinu

První metodou, kterou bylo prováděno stanovení neopterinu v moči je HPLC, poté byla tato metoda upravena i pro stanovení neopterinu v séru. Následně byly publikovány metody založené na imunologickém principu, nejprve to byla metoda na principu radioimunoanalýzy (RIA), poté i metoda enzymoimunoanalytická (ELISA). Korelace výsledků získaných HPLC i imunologickými metodami je velmi dobrá. Imunologické techniky jsou častěji používány pro rutinní stanovení větších sérií vzorků, ale HPLC je považována za referenční metodu [6][7].

3.1.1.1 HPLC

Přehled publikovaných HPLC metod stanovení neopterinu je uveden v tabulce číslo 3.

Tabulka 3: Přehled publikovaných HPLC metod stanovení neopterinu

| látka | materiál | stacionární fáze | teplota | mobilní fáze | průtok | detektor | citace |
|--|--|--|-----------|--|-------------|---|--------|
| neopterin, biopterin, pterin a další (celkem 12 pteridinů) | moč | ZIC-HILIC (100 x 2,1 mm, 3,5 μm) | neuvedeno | <ul style="list-style-type: none"> · 7 mmol/l mravenčan amonný pH 6,5 · acetonitril · gradientová eluce | 0,3 ml/min | hmotnostní spektrometr (ionizace ESI) | [8] |
| neopterin, biopterin, pterin a další (celkem 15 pteridinů) | moč | Luna phenyl-hexyl (150 x 3,0 mm, 3,0 μm) | 40 °C | <ul style="list-style-type: none"> · 0,025% kys. mravenčí ve vodě s 1 % acetonitrilu · methanol · gradientová eluce | 0,45 ml/min | hmotnostní spektrometr (ionizace ESI) | [9] |
| neopterin, kynurenin, tryptofan | plodová voda, maligní výpotek, exsudát z ran | Chromolith HighResolution RP-18e (100 x 4,6 mm) | 40 °C | <ul style="list-style-type: none"> · 15 mmol/l fosfátový pufr pH = 3 · acetonitril · gradientová eluce | 3 ml/min | fluorescenční neopterin: $\lambda_{\text{ex}} = 353 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{emis}} = 438 \text{ nm}$ tryptofan: $\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{emis}} = 404 \text{ nm}$ spektrofotometrický (PDA) kynurenin: $\lambda = 230 \text{ nm}$ | [10] |
| neopterin, biopterin, pterin a další (celkem 9 pteridinů) | sérum | Poroshell 120 (150 x 3,0 mm, 2,7 μm) | 22 °C | <ul style="list-style-type: none"> · 2 mmol/l mravenčan amonný pH = 7,1 | 0,4 ml/min | fluorescenční $\lambda_{\text{ex}} = 272 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{emis}} = 410 \text{ nm}, 445 \text{ nm}, 465 \text{ nm}$ | [11] |

Tabulka 3: Přehled publikovaných HPLC metod stanovení neopterinu – pokračování

| látka | materiál | stacionární fáze | teplota | mobilní fáze | průtok | detektor | citace |
|---|------------------------|---|-----------|--|---------------|---|--------|
| neopterin, biopterin, dihydroneopterin, dihydrobiopterin | moč | BEH Amide (100 x 2,1 mm, 1,7 μm) | 30 °C | · 50 mmol/l octan amonný pH = 6,8 · acetonitril · 15:85 | 0,4 ml/min | fluorescenční $\lambda_{\text{ex}} = 353 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{emis}} = 438 \text{ nm}$ | [12] |
| neopterin, biopterin, dihydrobiopterin, dihydroneopterin, tetrahydrobiopterin | mozko- míšní mok | Atlantis dC ₁₈ (150 x 4,6 mm, 3 μm) | 30 °C | · 0,05 mmol/l citrátový pufr pH = 7,4 · methanol · 97:3 | 0,6 ml/min | fluorescenční $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{emis}} = 450 \text{ nm}$ | [13] |
| neopterin, biopterin, pterin a další (celkem 8 pteridinů) | moč | LiChrospher C ₈ 60 RP select B (250 x 4,0 mm, 5 μm) | neuveдено | · 10 mmol/l fosfátový pufr pH = 7 · methanol · 95:5 | 0,5 ml/min | fluorescenční $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{emis}} = 444 \text{ nm}$ | [14] |
| neopterin, biopterin, pterin a další (celkem 8 pteridinů), kreatinin | moč | Luna phenyl-hexyl (150 x 3,0 mm, 3 μm) | 25 °C | · 0,1% kys. mravenčí · 0,2% kys. mravenčí v acetonitrilu · gradientová eluce | 0,3 ml/min | hmotnostní spektrometr (ionizace ESI) | [15] |
| neopterin, biopterin, pterin a další (celkem 10 pteridinů) | moč | Zorbax Eclipse XDB- C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 μm) | 22 °C | · voda s 0,1% kys. mravenčí a 2 % acetonitrilu · 0,1% kys. mravenčí v acetonitrilu · gradientová eluce | 0,6 ml/min | hmotnostní spektrometr (ionizace ESI) | [16] |

Tabulka 3: Přehled publikovaných HPLC metod stanovení neopterinu – pokračování

| látka | materiál | stacionární fáze | teplota | mobilní fáze | průtok | detektor | citace |
|---|-----------------|--|------------------------|--|---|--|---------------|
| neopterin, biopterin, pterin a další (celkem 11 pteridinů) | moč | Zorbax Eclipse XDB-C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 μm) | 23 °C | <ul style="list-style-type: none"> · 15 mmol/l Tris-HCl pufr pH = 6,1 · 15 mmol/l Tris-HCl pufr pH = 6,4 · gradientová eluce | 1 ml/min | fluorescenční λ _{ex} = 272 nm λ _{emis} = 410 nm, 445 nm, 465 nm | [17] |
| neopterin, isoxanthopterin, biopterin, pterin | moč | LUNA amino (150 x 2,0 mm, 3 μm) | neuvedena | <ul style="list-style-type: none"> · 0,1% kys. mravenčí v acetonitrilu · 0,1% kys. mravenčí a 10 mmol/l mravenčanu amonného ve vodě · 85:15 | 0,4 ml/min | hmotnostní spektrometr (ionizace ESI) | [18] |
| neopterin, kynurenin, tryptophan, kreatinin | sérum | spojené kolony Chromolith RP-18e (50 x 4,6 mm, 100 x 3,0 mm) s předkolonou (10 x 4,6 mm) | laboratorní teplota | <ul style="list-style-type: none"> · 15 mmol/l fosfátový pufr pH = 4,51 | 1 ml/min (0 – 3,1 min), 2,3 ml/min (3,1 – 8,2 min) | spektrofotometrický (PDA) kynurenin, kreatinin: λ = 230 nm fluorescenční neopterin: λ _{ex} = 353 nm, λ _{emis} = 458 nm tryptofan: λ _{ex} = 254 nm, λ _{emis} = 404 nm | [19] |
| neopterin, biopterin, pterin a další (celkem 5 pteridinů) | moč | Zorbax Eclipse XDB-C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 μm) | 25 °C | <ul style="list-style-type: none"> · 10 mmol/l citrátový pufr pH = 5,44 · acetonitril · 94,5:5,5 | 1 ml/min | fluorescenční λ _{ex} = 272 nm, λ _{emis} = 445 nm | [20] |

Z informací uvedených v tabulce číslo 3 vyplývá, že neopterin je poměrně často stanovován HPLC využívající reverzní fáze (nejčastěji C₁₈), jako mobilní fáze je u těchto metod používán fosfátový nebo citrátový pufr. Byly ale také publikovány práce využívající stacionární fáze fenyl-hexylové nebo HILIC. K detekci je většinou případů využíván fluorescenční detektor.

3.1.1.2 Imunologické metody

Principem všech imunologických metod je specifická reakce antigenu a protilátky. Jedna ze součástí této reakce je značena, v případě metody ELISA pomocí enzymu, v případě RIA metody radioaktivním izotopem. V dnešní době je na trhu poměrně velké množství komerčně vyráběných souprav pro ELISA stanovení neopterinu. RIA metody jsou postupně vytlačovány ELISA metodami, a to především díky rizikům, která jsou spojena s manipulací s radioaktivním materiálem.

V tabulce číslo 4 je uveden přehled několika komerčně dostupných sad pro ELISA stanovení neopterinu. Ve všech případech je ke stanovení využita kompetitivní ELISA. Tato metoda je založena na konkurenci mezi neznačeným neopterinem (ze vzorku) a neopterinem značeným enzymem (ve většině případů peroxidázou). Značený a neznačený neopterin soutěží o vazebná místa na protilátce, která je navázána uvnitř jamek mikrotitrační destičky. Nenavázaný neopterin je odstraněn promytím. Intenzita zabarvení, vzniklá po přidání substrátu (nejčastěji tetramethylbenzidinu) je nepřímo úměrná množství neopterinu ve vzorku. U dvou souprav je tato metoda mírně modifikovaná, neopterin je značený biotinem a enzym je vázaný na avidin [21].

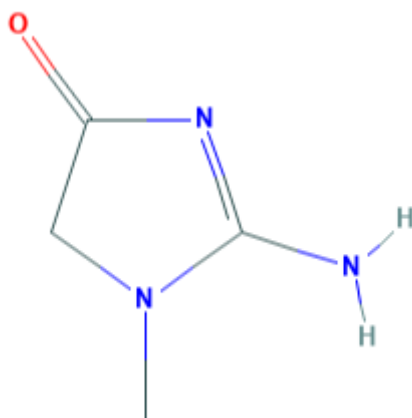
Na trhu je dostupná pouze jedna RIA souprava pro stanovení neopterinu od výrobce B·R·A·H·M·S (Hennigsdorf, Německo). Princip metody je podobný jako u kompetitivní ELISA, dochází ke kompetici neznačeného neopterinu a neopterinu značeného radioaktivním izotopem jódu ¹²⁵I o vazebná místa na protilátce. Po přidání promývacího roztoku, centrifugaci a odstranění supernatantu je měřena radioaktivita sedimentu, ta je nepřímo úměrná množství neopterinu ve vzorku. Výrobce uvádí citlivost této soupravy 0,8 nmol/l a kalibrační rozmezí 3 – 729 nmol/l [22].

Tabulka 4: Přehled komerčně dostupných souprav pro stanovení neopterinu ELISA metodou

| název soupravy | výrobce | materiál | princip | enzym | substrát | detekce | kalibrační rozmezí | mez detekce | citace |
|-----------------------------|---|--|----------------|--|---------------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------|---------------|
| Neopterin EIA | B·R·A·H·M·S (Hennigsdorf, Německo) | sérum, plazma, moč | kompet. ELISA | alkalická fosfatáza | 4-nitro-fenylfosfát | spektrofotometrická při 405 nm | 2 – 250 nmol/l | 2 nmol/l | [21] |
| Neopterin ELISA | IBL International (Hamburk, Německo) | sérum, plazma, moč | kompet. ELISA | peroxidáza | tetramethylbenzidin | spektrofotometrická při 450 nm | 1,35 – 111 nmol/l | 0,7 nmol/l | [5] |
| Neopterin ELISA Kit (Human) | Aviva Systems Biology (San Diego, USA) | sérum, plazma, homogenizovaná tkáň a další biologické tekutiny | kompet. ELISA | peroxidáza vázaná na avidin (neopterin je značen biotinem) | tetramethylbenzidin | spektrofotometrická při 450 nm | 0,62 – 40 nmol/l | 0,4 nmol/l | [23] |
| Neopterin ELISA | Demeditec Diagnostics (Kiel, Německo) | sérum, plazma, moč | kompet. ELISA | peroxidáza | tetramethylbenzidin | spektrofotometrická při 450 nm | 1,35 – 111 nmol/l | 0,7 nmol/l | [24] |
| Human Neopterin ELISA Kit | BT LAB (Šanghaj, Čína) | sérum, plazma, homogenizovaná tkáň a další biologické tekutiny | kompet. ELISA | peroxidáza vázaná na avidin (neopterin je značen biotinem) | tetramethylbenzidin | spektrofotometrická při 450 nm | 0,1 – 38 nmol/l | 0,061 nmol/l | [25] |

3.2 Kreatinin

Systematický název je 2-amino-1,5-dihydro-1-methyl-4H-imidazol-4-on. Molekulová hmotnost je 113,12 g/mol. Strukturou jde o cyklický imid kreatinu (kyseliny N-methylguanidinoctové). Vzorec kreatininu je zobrazen na obrázku číslo 3 [26].



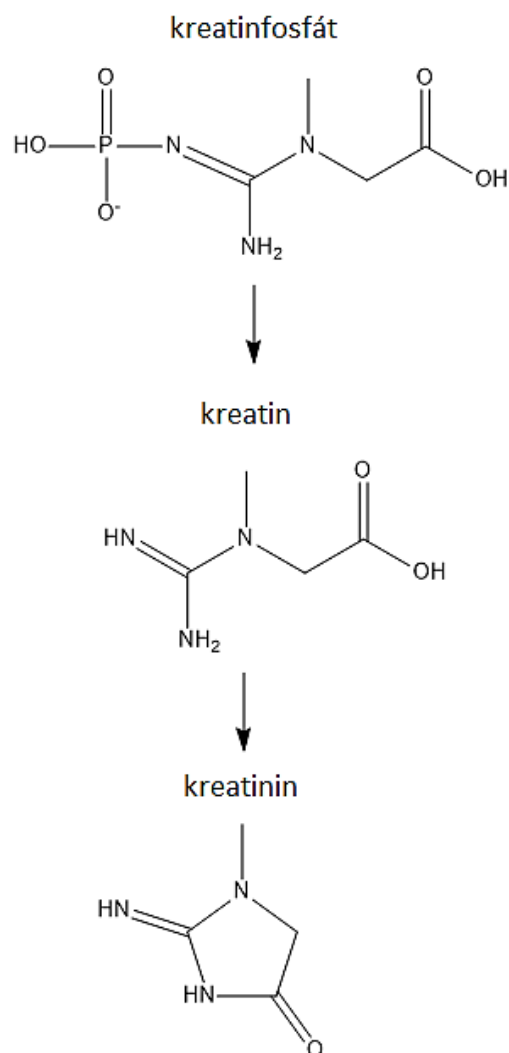
Obrázek 3: Vzorec kreatininu [26]

Kreatinin vzniká ve svalech neenzymovou dehydratací a spontánní cyklizací z kreatinu. Kreatin vzniká odštěpením fosfátu z kreatinfosfátu, který slouží jako zdroj energie pro kontrakci svalu. Vznik kreatininu je znázorněn na obrázku číslo 4. Kreatinin nemůže být znovu fosforylován, přechází ze svalu do krve a následně je z organismu vyloučen [27].

Kreatinin je z lidského těla vylučován ledvinami především glomerulární filtrací, v menší míře také tubulární sekrecí. Clearance inulinu, což je látka exogenního původu vylučovaná pouze glomerulární filtrací, je o 5 – 10 % nižší než clearance kreatininu, díky tomu lze alespoň odhadem určit míru tubulární sekrece kreatininu. Při zvýšení koncentrace v krvi dochází k vylučování i dalšími cestami, ve větší míře se uplatňuje tubulární sekrece a také vylučování do lumen střeva. [27].

Normální hodnoty v krvi stanovené Ústavem klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové (ÚKBD FN HK) jsou u mužů starších 15 let 59 – 104 $\mu\text{mol/l}$ a u žen starších 15 let 45 – 84 $\mu\text{mol/l}$. Normální hodnoty v moči jsou u mužů 9 – 19 mmol/den a u žen 6 – 13 mmol/den. Stanovení ve sbírané moči má díky změnám ve vylučování kreatininu během dne lepší výpovědní hodnotu [28].

Zvýšené hodnoty v krvi mohou být způsobeny poškozením svalů (polytraumata, operace), ledvin, krevního oběhu. Hladina v krvi závisí také na množství svalové hmoty, nižší hodnoty mají děti, starší osoby, osoby s atrofií svalstva a dlouhodobě imobilizovaní pacienti. Hladina v krvi klesá při zvýšení glomerulární filtrace, k tomu dochází fyziologicky při těhotenství, nebo podáváním některých léků [29].



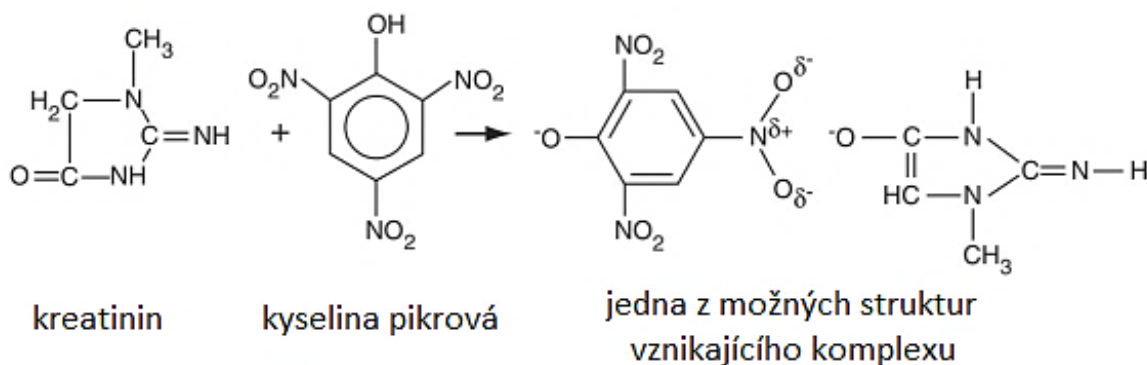
Obrázek 4: Vznik kreatininu

3.2.1 Metody stanovení kreatininu

Kreatinin je v moči i séru v klinických laboratořích stanovován chemickými metodami (Jaffého reakce), nebo metodami enzymatickými. Jaffého reakce je vhodná především pro stanovení v moči, případně pro nižší koncentrace v krvi a není příliš vhodná pro pediatrické vzorky. Při splnění těchto předpokladů a korekci interferujících látek má Jaffého reakce srovnatelnou přesnost s metodami enzymatickými. Výhodou enzymatických metod je potřeba menšího objemu vzorku a menší náchylnost k interferencím, jejich nevýhodou je ale vyšší ekonomická náročnost než u Jaffého reakce. Další možností stanovení jsou metody využívající HPLC, k detekci je možné využít UV detektor, nebo hmotnostní spektrometr (MS). HPLC metody mají vysokou specifitu i přesnost, metoda HPLC-MS slouží jako referenční [30][31][32].

3.2.1.1 Jaffého reakce

Princip Jaffého reakce je znám již od roku 1886. Dnes využívané postupy jsou založeny na různých modifikacích původní Jaffého metody. Jako Jaffého reakce je nazývána reakce kreatininu a kyseliny pikrové (trinitrobenzoové) probíhající v alkalickém prostředí. Během reakce vzniká barevný produkt, intenzita jeho zbarvení je přímo úměrná koncentraci kreatininu ve vzorku. Princip Jaffého reakce je uveden na obrázku číslo 5 [30].



Obrázek 5: Jaffého reakce [30]

Nevýhodou Jaffého reakce je její nízká specifita, interferovat mohou látky endogenního i exogenního původu. Falešně zvýšené hodnoty způsobují například ketolátky, glukóza, močovina, bílkoviny a kyselina askorbová, falešně snížené hodnoty způsobují bilirubin a hemoglobin. Snížit vliv interferujících látek je možné například absorpcí kreatininu na sorbent (například křemičitan hlinitý). Interferenci bilirubinu lze odstranit přidávkem hexakynoželizitanu draselného, který způsobí oxidaci bilirubinu na biliverdin [30].

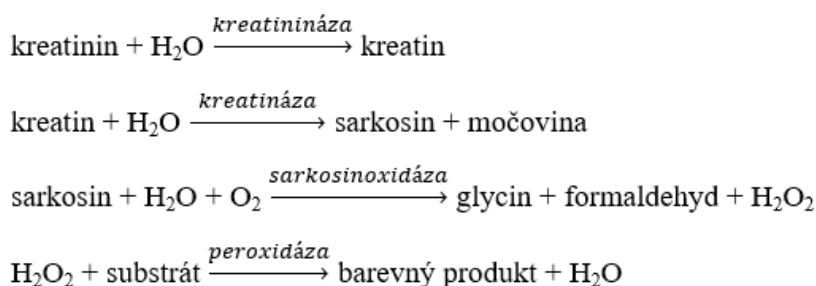
V tabulce číslo 5 je uveden přehled vybraných komerčně dostupných souprav pro stanovení kreatininu Jaffého metodou. Z informací uvedených v tabulce vyplývá, že je možné Jaffého metodou stanovit kreatinin v moči, plazmě, séru i jiných biologických tekutinách. Detekce probíhá spektrofotometricky při vlnové délce 490 nm nebo 510 nm.

Tabulka 5: Přehled komerčně dostupných souprav pro stanovení kreatininu Jaffého metodou

| název soupravy | výrobce | materiál | detekce | kalibrační rozmezí | mez detekce | citace |
|--|---|---|-----------------------------------|--------------------------------|-----------------------|---------------|
| Invitrogen Creatinine Urinary Detection Kit | Thermo Fisher Scientific (Vantaa, Finsko) | moč | spektrofotometrická při 490 nm | 26,5 – 1768 $\mu\text{mol/l}$ | 1,7 $\mu\text{mol/l}$ | [33] |
| Creatinine Parameter Assay Kit | R&D Systems (Minneapolis, USA) | moč | spektrofotometrická při 490 nm | 26,5 – 1768 $\mu\text{mol/l}$ | 6,2 $\mu\text{mol/l}$ | [34] |
| Creatinine Assay Kit (Colorimetric) | Abcam (Cambridge, Velká Británie) | moč | spektrofotometrická při 490 nm | 27,4 - 1768 $\mu\text{mol/l}$ | 3,7 $\mu\text{mol/l}$ | [35] |
| QuantiChrom Creatinine Assay Kit | BioAssay Systems (Hayward, USA) | sérum, plazma, moč a další biologické tekutiny | spektrofotometrická při 510 nm | 8,8 – 26520 $\mu\text{mol/l}$ | 8,8 $\mu\text{mol/l}$ | [36] |
| DetectX Serum Creatinine Kit | Arbor Assays (Ann Arbor, USA) | sérum, plazma | spektrofotometrická při 490 nm | 66,3 – 334,2 $\mu\text{mol/l}$ | 7,2 $\mu\text{mol/l}$ | [37] |

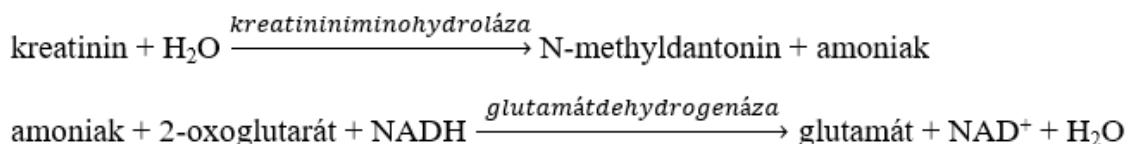
3.2.1.2 Enzymatické metody

V tabulce číslo 6 je uveden přehled vybraných komerčně dostupných souprav pro enzymatické stanovení kreatininu. Z informací uvedených v tabulce vyplývá, že všechny komerčně dodávané soupravy využívají ke stanovení následující princip: kreatinin je nejprve pomocí enzymu kreatininázy přeměněn na kreatin. Vzniklý kreatin je při reakci katalyzované enzymem kreatinázou rozložen na močovinu a sarkosin. Sarkosin je v další reakci, katalyzovanou enzymem sarkosinoxidázou, přeměněn na glycin, formaldehyd a peroxid vodíku. Vznikající peroxid vodíku v přítomnosti enzymu peroxidázy oxiduje substrát za vzniku barviva. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci kreatininu ve vzorku. Detekce probíhá spektrofotometricky při vlnové délce 515 – 570 nm, u tří souprav je možná i fluorescenční detekce. Princip stanovení je uveden na obrázku číslo 6. Nevýhodou této metody je ovlivnění výsledku kreatinem nebo sarkosinem přítomným ve vzorku. Vliv těchto látek je možné odstranit měřením proti slepému roztoku (blanku) [38][39].



Obrázek 6: Enzymatické stanovení kreatininu pomocí kreatininázy

V literatuře je také uvedeno stanovení pomocí enzymu kreatininiminohydroláza, tento enzym katalyzuje hydrolyzu kreatininu na amoniak a N-methylhydantoin. Vzniklý amoniak je prokázán reakcí s 2-oxoglutarátem a NADH za vzniku glutamátu a NAD^+ , reakce je katalyzována glutamátdehydrogenázou. Při reakci dochází k poklesu absorbance měřené při vlnové délce 340 nm, pokles absorbance je přímo úměrný koncentraci kreatininu ve vzorku. Princip reakce je uveden na obrázku číslo 7. Tato reakce ale není v komerčně dostupných soupravách využita [30].



Obrázek 7: Enzymatické stanovení kreatininu pomocí kreatininiminohydrolázy

Tabulka 6: Přehled komerčně dostupných souprav pro stanovení kreatininu enzymatickou metodou

| název soupravy | výrobce | materiál | enzym | detekce | kalibrační rozmezí | mez detekce | citace |
|--|---------------------------------------|--|--------------------------|--|---|------------------------|---------------|
| Creatinine Assay Kit | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) | sérum, plazma, homogenizovaná tkáň a další biologické tekutiny | kreatinináza, kreatináza | spektrofotometrická při 570 nm fluorescenční $\lambda_{\text{ex}} = 535 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{emis}} = 587 \text{ nm}$ | neuveďeno | neuveďeno | [39] |
| Creatinine Assay Kit (Enzymatic) | Crystal Chem (Elk Grove Village, USA) | sérum, moč | kreatinináza, kreatináza | spektrofotometrická při 550 nm | sérum: 13,3 – 1193,4 $\mu\text{mol/l}$ moč: 13,3 – 12464,4 $\mu\text{mol/l}$ | 13,3 $\mu\text{mol/l}$ | [40] |
| Creatinine Assay kit (Colorimetric/Fluorometric) | Abcam (Cambridge, Velká Británie) | sérum, plazma, moč, mozkomíšní mok a další biologické tekutiny | kreatinináza, kreatináza | spektrofotometrická při 570 nm fluorescenční $\lambda_{\text{ex}} = 535 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{emis}} = 587 \text{ nm}$ | neuveďeno | neuveďeno | [41] |
| Creatinine Colorimetric Assay Kit | Elabscience (Wuhan, Čína) | sérum, plazma | kreatinináza, kreatináza | spektrofotometrická při 515 nm | 27,3 - 800 $\mu\text{mol/l}$ | 3,8 $\mu\text{mol/l}$ | [42] |
| Creatinine Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric) | LifeSpan BioSciences (Seattle, USA) | sérum, plazma, moč, mozkomíšní mok a další biologické tekutiny | kreatinináza, kreatináza | spektrofotometrická při 570 nm fluorescenční $\lambda_{\text{ex}} = 538 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{emis}} = 587 \text{ nm}$ | neuveďeno | neuveďeno | [43] |

3.2.1.3 HPLC

V tabulce číslo 7 je uveden přehled publikovaných metod pro HPLC stanovení kreatininu. Z informací uvedených v této tabulce vyplývá, že kreatinin je nejčastěji stanovován na reverzních fázích. Stanovení může být prováděno při teplotě 25 °C, ale i vyšší, byly publikovány metody, kde separace probíhá při 40 °C. Detekce je prováděna nejčastěji hmotnostním spektrometrem s ionizací elektrosprejem (ESI), nebo spektrofotometrická s využitím vlnových délek v rozmezí 225 – 240 nm.

Tabulka 7: Přehled publikovaných HPLC metod stanovení kreatininu

| látka | materiál | stacionární fáze | teplota | mobilní fáze | průtok | detektor | citace |
|--|-----------------|--|----------------|---|---------------|--|---------------|
| kreatinin, kreatin | sérum | Gemini C ₆ -Phenyl (150 x 4,6 mm, 5 μm) | neuvedeno | · 0,1% roztok kys. mravenčí ve vodě · methanol · gradientová eluce | 0,3 ml/min | hmotnostní spektrometr (ionizace ESI) | [44] |
| kreatinin, retinol | moč | Kinetex PFP (100 x 3,0 mm, 1,7 μm) | 25 °C | · 15 mmol/l mravenčan amonný pH = 3,0 · 5 mmol/l kys. mravenčí v 90% acetonitrilu · 28:72 | 0,5 ml/min | spektrofotometrický λ = 235 nm hmotnostní spektrometr (pro retinol, ionizace ESI) | [45] |
| kreatinin, kreatin, fosfokreatin | plazma | Hypersil Gold C ₁₈ (150 x 2,1 mm, 5 μm) | 35 °C | · 2 mmol/l octan amonný pH = 10 · methanol · gradientová eluce | 0,3 ml/min | hmotnostní spektrometr (ionizace ESI) | [46] |
| kreatinin a 10 purinů (adenin, guanin, kys. močová a další) | moč | ACE Excel 2 AQ (150 x 2,1 mm, 2 μm) | 40 °C | · 0,01% kys. mravenčí · acetonitril · gradientová eluce | 0,3 ml/min | spektrofotometrický λ = 240 nm hmotnostní spektrometr (ionizace ESI) | [47] |
| kreatinin, kys. močová | sliny | Poroshell EC-C ₁₈ (50 x 3,0 mm, 2,7 μm) | 45 °C | · voda, acetonitril a kys. mravenčí v poměru 947:50:3 · acetonitril, kys. mravenčí v poměru 998:2 · gradientová eluce | 0,5 ml/min | hmotnostní spektrometr (ionizace ESI) | [48] |

Tabulka 7: Přehled publikovaných HPLC metod stanovení kreatininu – pokračování

| látka | materiál | stacionární fáze | teplota | mobilní fáze | průtok | detektor | citace |
|---|-----------------|---|------------------------|---|---------------|--|---------------|
| kreatinin | plazma | Luna Silica (150 x 4,6 mm, 5 µm) | 40 °C | · 2 mmol/l octan amonný · acetonitril · 45:55 | 1,5 ml/min | hmotnostní spektrometr (ionizace ESI) | [49] |
| kreatinin, kreatin | moč | 214 TP C ₄ (250 x 4,6 mm, 5 µm) | 25 °C | · voda · acetonitril · gradientová eluce | 0,5 ml/min | spektrofotometrický λ = 205 nm | [50] |
| kreatinin | moč | XTerra C ₁₈ (100 x 2,1 mm, 3,5 µm) | 25 °C | · 0,1% kys. mravenčí, · 0,1% kys. mravenčí v acetonitrilu · gradientová eluce | 0,1 ml/min | hmotnostní spektrometr (ionizace ESI) | [51] |
| kreatinin | moč | Acquity UPLC HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm) | 40 °C | · 0,1% NH ₄ OH | 0,2 ml/min | hmotnostní spektrometr (ionizace ESI) | [52] |
| kreatinin, kys. močová, kynurenin, tryptofan | plazma | Agilent HC-C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm) | laboratorní teplota | · 20 mmol/l octan sodný, 30 mmol/l kys. octová, 30 ml/l methanol · 20 mmol/l octan sodný, 30 mmol/l kys. octová, 100 ml/l methanol, 100 ml/l acetonitril · gradientová eluce | 1 ml/min | spektrofotometrický λ = 234 nm, 308 nm, 365 nm, 280 nm | [53] |
| kreatinin | moč | Cogent Diamond- Hydride (150 x 2,1 mm, 4 µm) | 25 °C | · 1% kys. mravenčí · 1% kys. mravenčí v acetonitrilu · gradientová eluce | 0,2 ml/min | hmotnostní spektrometr (ionizace ESI) | [54] |

Tabulka 7: Přehled publikovaných HPLC metod stanovení kreatininu – pokračování

| látka | materiál | stacionární fáze | teplota | mobilní fáze | průtok | detektor | citace |
|---|-------------------------|--|------------------------|---|----------------|--|---------------|
| kreatinin, neopterin, biopterin, pterin a další (celkem 8 pteridinů) | moč | Luna phenyl- hexyl (150 x 3,0 mm, 3 μm) | 25 °C | <ul style="list-style-type: none"> · 0,1% kys. mravenčí · 0,2% kys. mravenčí v acetonitrilu · gradientová eluce | 0,3 ml/min | hmotnostní spektrometr (ionizace ESI) | [15] |
| kreatinin, kys. hippurová | moč – suchá kapka | Hypersil Gold C ₁₈ (150 × 4,6 mm, 3 μm) | 40 °C | <ul style="list-style-type: none"> · 5 mmol/l triethylammonium fosfátový pufr pH = 3,3 · acetonitril · 90:10 | 1 ml/min | spektrofotometrický λ = 225 nm | [55] |
| kreatinin, kys. močová | moč, slzy | Zorbax SB-CN (150 x 4,6 mm, 5 μm), C ₁₈ předkolona | neuveďeno | <ul style="list-style-type: none"> · 10 mmol/l fosfátový pufr pH = 6,85 · acetonitril · 95:5 | 0,65 ml/min | spektrofotometrický λ = 235 nm | [56] |
| kreatinin, kys. močová | moč, plazma | ZORBAX SB-C ₁₈ (100 x 3,0 mm, 3,5 μm) | laboratorní teplota | <ul style="list-style-type: none"> · 20 mmol/l octan sodný, 30 mmol/l kys. octová, 1% methanol | 0,4 ml/min | spektrofotometrický λ = 234 nm | [57] |

3.2.1.4 Další metody

Stanovení kreatininu je možné provádět i jinými metodami, přehled dalších publikovaných metod je uveden v tabulce číslo 8. Na trhu jsou dostupné také soupravy pro stanovení kreatininu metodou ELISA [58].

Tabulka 8: Další publikované metody pro stanovení kreatininu

| látka | materiál | metoda | detekce | citace |
|--|-----------------|----------------------------|--|---------------|
| kreatinin, kreatin | sérum | plynová chromatografie | hmotnostní spektrometr | [59] |
| kreatinin | moč | průtoková injekční analýza | amperometrický biosenzor | [60] |
| kreatinin, kys. mandlová, kys. hippurová | moč | kapilární elektroforéza | spektrofotometrická $\lambda = 200 \text{ nm}$ | [61] |
| kreatinin, acetát | moč | kapilární elektroforéza | vodivostní detektor | [62] |
| kreatinin | moč | Ramanova spektrometrie | | [63] |
| kreatinin | sérum | amperometrie | amperometrický biosenzor | [64] |
| kreatinin | moč | voltametrie | | [65] |

3.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je separační metoda založená na rozdílné distribuci separovaných látek mezi dvě nemísitelné fáze: mobilní a stacionární. Mobilní fáze je tvořena kapalinou a stacionární fáze tuhou látkou, nebo kapalinou pevně ukotvenou na pevném nosiči. Stacionární fází je naplněna chromatografická kolona, přes kterou prostupuje mobilní fáze pod vysokým tlakem [66][67].

Při separaci látek v chromatografickém systému dochází k neustálému ustalování rovnováhy separovaných látek mezi stacionární a mobilní fází. Distribuci látek mezi tyto fáze charakterizuje distribuční konstanta K_D . Čím je distribuční konstanta pro danou látku vyšší, tím více je látka zadržována stacionární fází a tím větší je její retence [66].

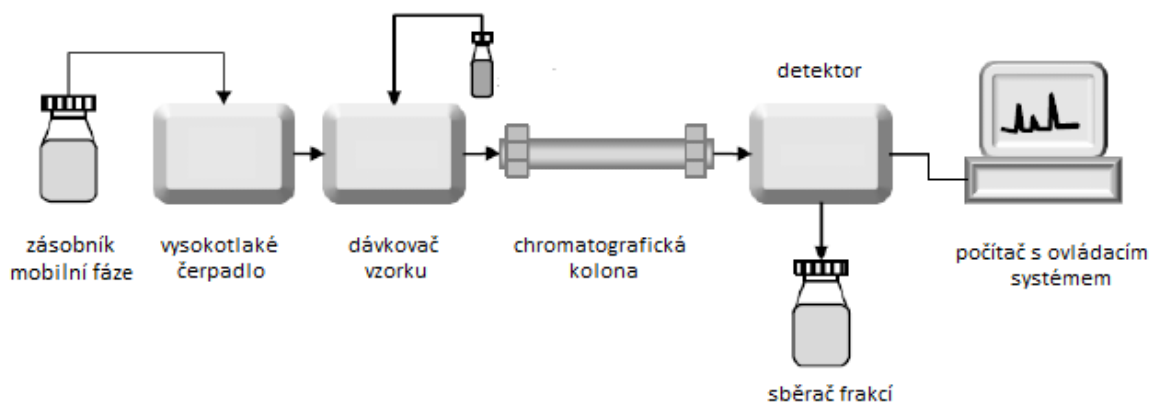
Základní charakteristikou každé separované látky je její retenční čas. Jedná se o čas, který uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky (vrcholu píku). Hlavní kvantitativní charakteristikou látek je plocha, případně výška píku [66].

3.3.1 Kapalinový chromatograf

Kapalinový chromatograf je složen z těchto částí:

- a) Zásobníky mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo (uchování a transport mobilní fáze)
- b) Autosampler (dávkování vzorku)
- c) Chromatografická kolona, termostat kolony (separace látek, zajištění stálé teploty separace)
- d) Detektor (detekce látek)
- e) Počítač a software (ovládání celého systému, záznam dat a jejich následné vyhodnocení) [66]

Schéma kapalinového chromatografu je uvedeno na obrázku číslo 8, jedná se o zjednodušené schéma, které může mít řadu obměn. Některé komponenty lze vyřadit, jiné naopak přidat. V průběhu chromatografické separace je mobilní fáze čerpána ze zásobníku pomocí vysokotlakého čerpadla, dále prochází přes odplynovač (degaser). Poté mobilní fáze přes dávkovač vzorku vstupuje do chromatografické kolony, která je umístěna v termostatovaném prostoru. Za kolonou následuje detektor, který může být doplněn sběračem frakcí, nebo je mobilní fáze vedena do odpadu. Signál je z detektoru veden do počítače, který obsahuje vyhodnocovací software [66].



Obrázek 8: Zjednodušené schéma kapalinového chromatografu [68]

3.3.2 Chromatografické principy využití v této práci

3.3.2.1 Separace na reverzních fázích

Při separaci na reverzních fázích (RP) je oproti normálně fázové (NP) chromatografii obrácena polarita mobilní a stacionární fáze. Mobilní fáze má polární a stacionární fáze nepolární charakter. Jako mobilní fáze jsou využívány směsi vodné složky (voda, pufr, zředěné vodné roztoky kyselin a bází) a polárního organického rozpouštědla mísitelného s vodou (alkoholy, acetonitril). Stacionární fáze je tvořena nepolárními alifatickými skupinami (oktadecyl -C₁₈, oktyl -C₈, kyano -CN, amino -NH₂), které jsou navázány na povrch nosiče (silikagel, hybridní sorbent, kovové oxidy). Analýzu je možné provádět mobilní fází obsahující pouze vodnou složku, je k tomu ale nutné využít kompatibilní stacionární fázi [66][69].

Na stacionární fázi se nenachází adsorpční centra schopná polárních interakcí. Při separaci se uplatňují slabé disperzní síly (nespecifické mezimolekulové interakce analyt-adsorbent). Tyto nespecifické interakce jsou mnohem slabší než interakce polární, navíc jsou ještě zeslabovány polárními interakcemi mezi mobilní fází a analytem, které ulehčují návrat molekul analytů do objemu polárního elučního činidla [66].

Na retenci látek má vliv několik faktorů:

- Polarita analytů – jako první jsou z kolony eluovány látky iontové a polární, s klesající polaritou se zvyšuje interakce látek se stacionární fází a tím se zvyšuje jejich retence.
- Složení mobilní fáze – retence klesá s rostoucím podílem organického rozpouštědla a s klesající polaritou organického rozpouštědla.

- pH mobilní fáze – změnou pH mobilní fáze může dojít k potlačení disociace slabých kyselin nebo bazí a tím ke zvýšení jejich retence.
- Přítomnost přísad v mobilní fázi – přísady, které tvoří s ionizovanými nebo silně polárními analyty iontové asociáty, nebo iontové páry zvyšují retenci těchto látek.
- Typ stacionární fáze – retence látek závisí na množství nepolární fáze na nosiči (obsah uhlíku a délka řetězců). S rostoucí délkou vázaného řetězce retence roste.
- Přítomnost substituentů na analytu – retence látek se zvyšuje s počtem aromatických jader a objemných substituentů (především halogenů), naopak přítomnost silně polárních a iontových skupin retenci snižuje.
- Teplota – retence látek s rostoucí teplotou klesá [66][70].

Separace na RP je velmi univerzální. Může sloužit k analýze jednoduchých směsí malých molekul, stejně tak i pro složité směsi jako je biologický materiál. Díky těmto výhodám je separace na RP nejčastěji využívanou HPLC technikou [66].

3.3.2.2 Hydrofilní interakční chromatografie

Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) je chromatografická technika, která využívá k separaci polární stacionární fázi podobně jako NP chromatografie. Hlavní rozdíl je ale v použité mobilní fázi, ta je tvořena organickou složkou (nejčastěji více než 50 % acetonitrilu) a menším množstvím vodné složky (alespoň 2,5 % vody nebo vhodného pufru). Při detekci pomocí hmotnostního spektrometru je nutné použít těkavé soli (amonné soli mravenčí nebo octové kyseliny). Stacionární fáze může být tvořena samotným silikagelem, nebo nosičem (silikagel, hydrofilní polymer, hybridní materiál, zirkon), na který jsou navázány funkční skupiny (hydroxyethylová, amino skupina, zwitterion, nebo další polární skupiny) [66][71][72].

Princip HILIC separace ještě není úplně objasněn, předpokládá se, že se jedná o komplexní proces, který je ovlivňován několika mechanismy. Jedním z mechanismů je distribuce látek mezi hydrofilní vrstvou vody vázanou na povrchu polární stacionární fáze a hydrofobní částí mobilní fáze. Dalším mechanismem je adsorpce analytů na funkční skupiny, které se nacházejí na stacionární fázi. Při tomto procesu se uplatňují vodíkové vazby, hydrofobní interakce a elektrostatické síly, vliv těchto interakcí závisí na složení mobilní fáze (především na obsahu vody) [71].

Retence látek je ovlivňována mnoha faktory. Zvyšuje se s rostoucí polaritou analytu a snižuje se zvyšováním polarity mobilní fáze (klesá s rostoucím podílem vody nebo pufru). Retence je ovlivňována přidávkem pufrů do mobilní fáze, snižuje se zvýšenou koncentrací solí. Pokud dojde změnou pH mobilní fáze k disociaci analytu, jeho retence se zvyšuje. Retence je také ovlivňována teplotou, při které dochází k separaci [66].

Na účinnost separace má vliv rozpouštědlo vzorku a dávkovaný objem. Rozpouštědlo vzorku by mělo co nejvíce odpovídat mobilní fázi. Pokud rozpouštědlo obsahuje vysoký podíl vody, může dojít ke snížení separační účinnosti a snížení retence. Při dávkování větších objemů vzorku dochází k rozmývání chromatografických píků a snížení separační účinnosti [66].

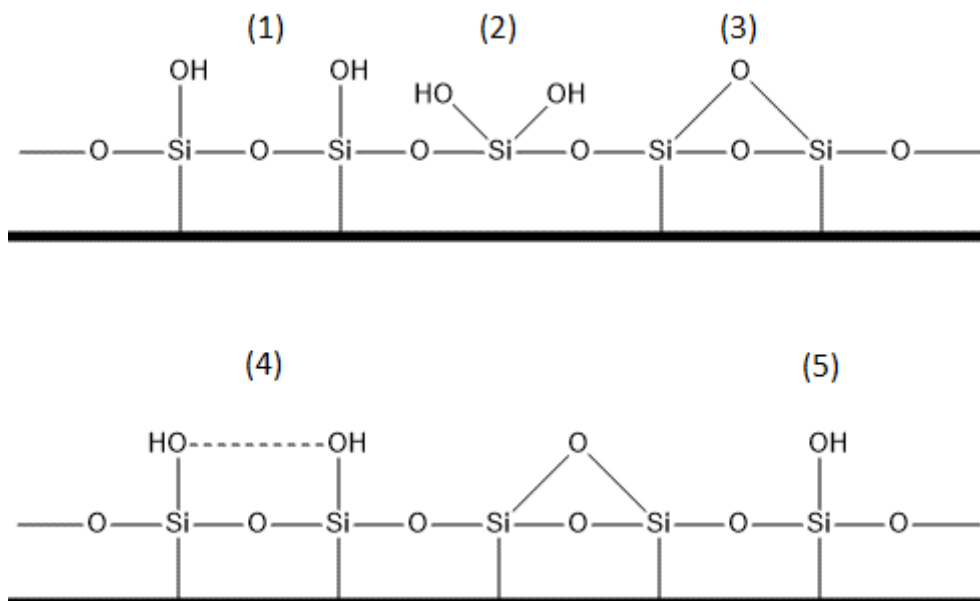
HILIC je vhodná pro separaci polárních, hydrofilních a bazických sloučenin, jejichž separace na RP je obtížná. Výhodou HILIC je kompatibilita používaných mobilních fází s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie. Mobilní fáze bohaté na acetonitril zlepšují účinnost ionizace a tím i citlivost detekce, především při využití ionizace elektrosprejem. Výhodou je také nižší viskozita mobilní fáze oproti využití RP, tím lze dosáhnout vyšších průtoků mobilní fáze kolonou bez zvýšení zpětného tlaku [66][71].

3.3.3 Typy stacionárních fází využitých v této práci

3.3.3.1 Silikagel

Silikagelové stacionární fáze jsou využívány při separacích na NP a při HILIC. Silikagel má vysokou mechanickou odolnost a v přítomnosti rozpouštědel nebobtná, ani se nesráží. Díky těmto vlastnostem se jedná o materiál velmi vhodný pro výrobu HPLC kolon. Hlavní nevýhodou je jeho nízká chemická odolnost, při nízkém pH dochází ke kyselé hydrolyze, při vysokém pH k rozpouštění silikagelu. Na nízkou chemickou odolnost je nutné brát ohled při výběru mobilních fází [66].

Chemické složení silikagelu je $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. Voda je vázána v nestechiometrickém množství, jejím navázáním vznikají silanolové skupiny Si-OH, které jsou hlavními aktivními centry silikagelu a jsou zodpovědné za jeho polární, slabě kyselý charakter. Silanolové skupiny jsou na povrchu silikagelu rozmístěny nerovnoměrně a dělí se na několik typů s různou kyselostí, to má hlavní vliv na chromatografické chování silikagelu. Typy silanolových skupin jsou znázorněny na obrázku číslo 9. Typ a množství silanolových skupin na povrchu silikagelu je možné ovlivnit výrobním postupem, díky tomu je možné vyrábět kolony s téměř identickými vlastnostmi a vysokou reprodukovatelností separace [66][73].

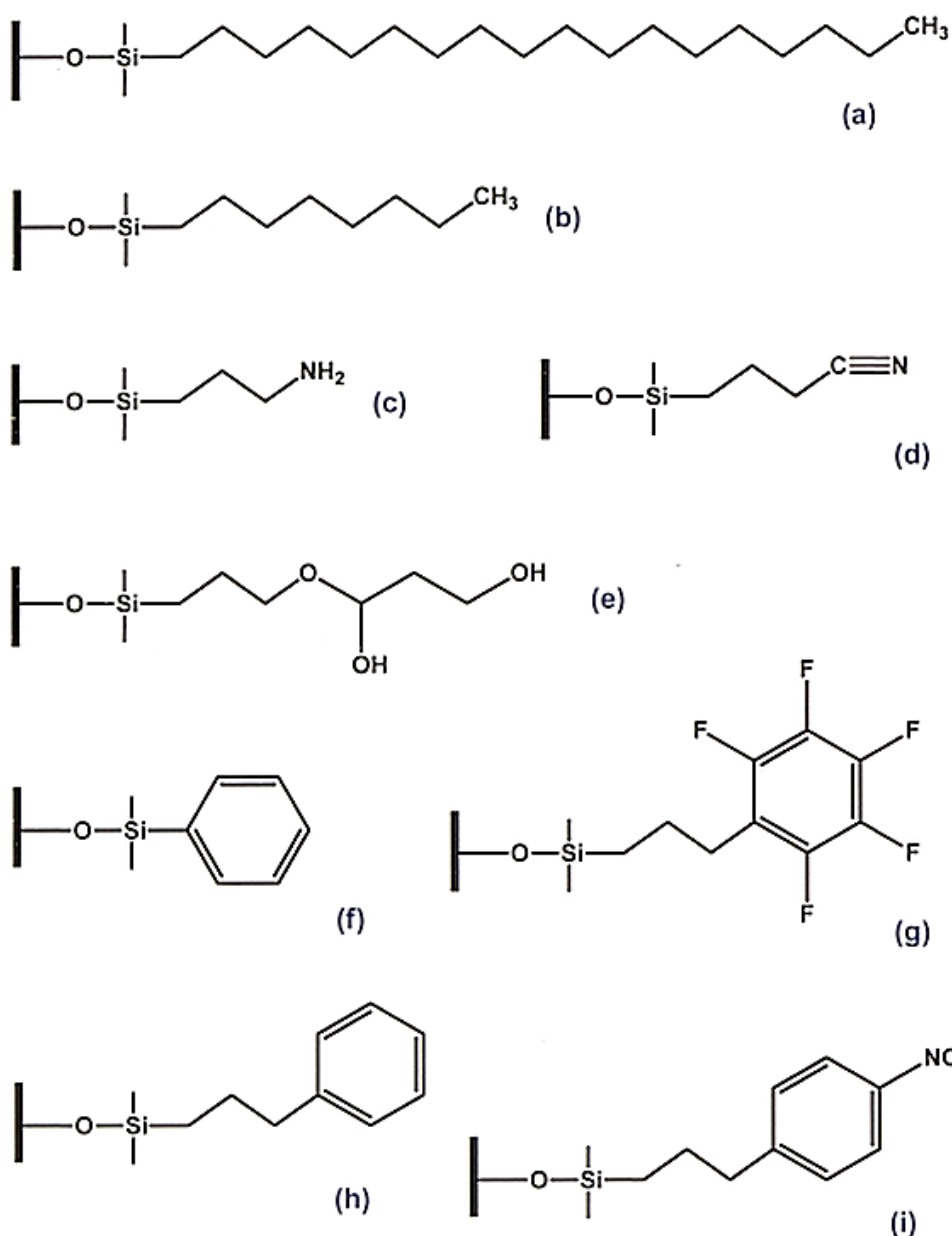


Obrázek 9: Typy silanolových skupin na povrchu silikagelu: (1) vicinální silanolové skupiny, (2) geminální silanolové skupiny, (3) siloxanové skupiny, (4) asociované silanolové skupiny, (5) izolovaná silanolová skupina [66]

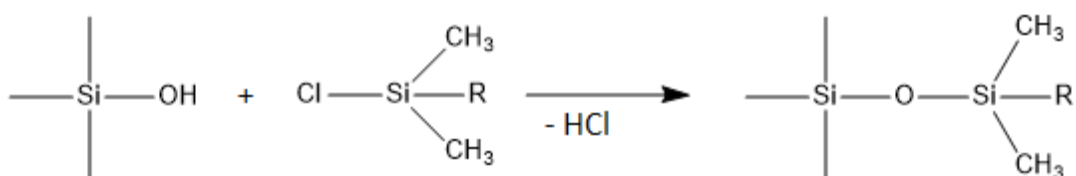
3.3.3.2 Chemicky vázané fáze na bázi silikagelu

Tyto stacionární fáze jsou založeny na modifikaci povrchových silanolových skupin silikagelu vhodnými ligandy, silikagel tedy slouží pouze jako nosič. Na vlastnostech využitých ligandů pak závisí selektivita vyrobené fáze. Jako ligandy jsou používány polární i nepolární funkční skupiny, ale i skupiny vhodné pro iontově výměnnou nebo chirální separaci. Přehled některých chemicky vázaných stacionárních fází je uveden na obrázku číslo 10 [66].

Výroba těchto stacionárních fází probíhá většinou reakcí silikagelu s alkylchlorosilany, tato reakce je znázorněna na obrázku číslo 11. Díky sterickým vlivům nemůže dojít k modifikaci všech silanolových skupin vyskytujících se na povrchu silikagelu, kvůli tomu zůstávají některé skupiny volné a mohou být přístupné separovaným látkám. To může způsobovat asymetrii píků bazických látek, až jejich ireverzibilní adsorpci. Volné silanolové skupiny jsou také zodpovědné za snížení odolnosti sorbentu vůči kyselé hydrolyze [66].



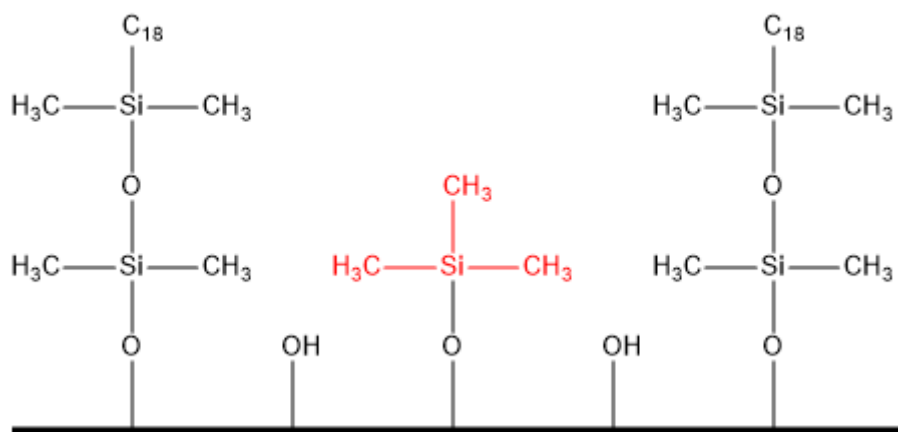
Obrázek 10: Přehled chemicky vázaných stacionárních fází: C_{18} (a), C_8 (b), propylaminová fáze (c), propylkyanová fáze (d), diolová fáze (e), fenylová fáze (f), pentafluorfenyl (g), propylfenyl (h), propylnitrofenyl (i) [66]



Obrázek 11: Chemická modifikace silikagelu

Nežádoucí vlivy volných silanolových skupin lze omezit několika způsoby: úpravou mobilní fáze, sterickým stíněním nebo endcappingem. Přídavkem organických aminů (například triethylaminu) do mobilní fáze dojde k blokování interakce silanolových skupin s molekulami analytu, tento postup ale nezvyšuje odolnost vůči hydrolyze sorbentu. Další možností je sterické stínění volných silanolových skupin, k tomu jsou využívány objemné alkylové substituenty (diisobutyl, diisopropyl, fenyl). Tato metoda způsobuje zvýšení stability stacionárních fází v kyselém pH (až do pH 1) [66][73].

Volné silanolové skupiny je možné blokovat endcappingem. Tato technika využívá reakci volných silanolových skupin s organosilanem (například trimethylchlorsilan), ten má díky své menší molekule lepší sterický přístup k silanolovým skupinám. Princip endcappingu je graficky znázorněn na obrázku číslo 12. Nevýhodou endcappingu je ale vysoká náchylnost krátkých substituentů k hydrolyze. Je možné využít pouze mobilní fáze v rozmezí pH 2 – 9. Tuto nevýhodu odstraňuje technika dvojitého endcappingu. Jedná se o dvojitou vazbu skupiny C₁₈ s volnými silanolovými skupinami na povrchu silikagelu. Výsledkem je propojení dvou alkyl silanolových skupin propylenovým můstkem. Tato modifikace umožňuje využití mobilní fáze o pH 1,5 – 11,5 [66][73].



Obrázek 12: Grafické znázornění endcappingu [66]

Analýza polárních látek vyžaduje použití mobilní fáze s nízkou eluční silou, tedy 100% vodné mobilní fáze. Běžné RP stacionární fáze tvořené modifikovaným silikagelem (například C₁₈) k tomuto využití nejsou vhodné. Vodná mobilní fáze není schopna dostatečného smáčení hydrofobních řetězců, což vede k jejich zhroucení neboli hydrofobnímu kolapsu. Díky kolapsu řetězců dochází k výraznému snížení separační účinnosti kolony, až k úplné ztrátě její funkce. Tento stav je ale většinou reverzibilní, funkci kolony lze obnovit proplachem mobilní fází s obsahem alespoň 10 % acetonitrilu [66][70].

Aby bylo možné RP stacionární fáze použít s vodnou mobilní fází a bylo zabráněno hydrofobnímu kolapsu, musí být stacionární fáze modifikována jedním z následujících způsobů:

- krátkými alkylovými řetězci bez pokrytí volných silanolových skupin
- hydrofilním polárním endcappingem
- vložení polární fáze (trojitý endcapping)
- dlouhými alkylovými řetězci
- velkým průměrem pórů [66]

3.3.3.3 Hybridní fáze

Hybridní stacionární fáze jsou tvořeny kombinací anorganického silikagelu a organosilanu. Tato technologie spojuje výhody silikagelu (vysoká účinnost, mechanická odolnost) a organického polymeru (chemická a teplotní stabilita, eliminace volných silanolových skupin). Hybridní fáze mohou být modifikovány navázáním ligandů stejně jako běžný silikagel [66].

Tyto stacionární fáze se podle technologie výroby dělí na první a druhou generaci. První generace je vyráběna reakcí methyltriethoxysilanu a tetraethoxysilanu. Vlastnosti takto vzniklých stacionárních fází jsou podobné běžnému silikagelu. Mají ale méně volných silanolových skupin, protože došlo k jejich částečnému nahrazení methylovými skupinami. Druhá generace vzniká reakcí 1,2-bis(triethoxysilyl)ethanu s tetraethoxysilanem a má ještě méně volných silanolových skupin než generace předchozí [74].

3.3.3.4 Monolitické fáze

Monolitické kolony jsou vytvořeny z jednoho kusu porézního materiálu. Sorbent, kterým je kolona tvořena má dva druhy pórů. Velké póry (makropóry) zrychlují průtok mobilní fáze kolonou a zajišťují rychlý převod hmoty mezi stacionární a mobilní fází. Druhým typem jsou střední póry (mesopóry), které poskytují dostatečně velkou separační kapacitu. Díky těmto vlastnostem může dojít ke zvýšení průtokové rychlosti mobilní fáze kolonou bez ztráty separační účinnosti a bez zvýšení zpětného tlaku. Podle typu stacionární fáze se dělí na anorganické monolity, organické monolity a hybridní monolity [66][75].

Anorganické monolity jsou tvořeny materiálem na bázi silikagelu. Morfologie monolitu závisí na reakčních podmínkách, při kterých byl vyroben, vliv má složení polymerační směsi, koncentrace katalyzátoru a reakční teplota. Výhodou je snadná modifikace vzniklého monolitu funkčními skupinami, tím je umožněno využití v chromatografii na RP. Nevýhodou je, že při zrání monolitu dochází k jeho objemové

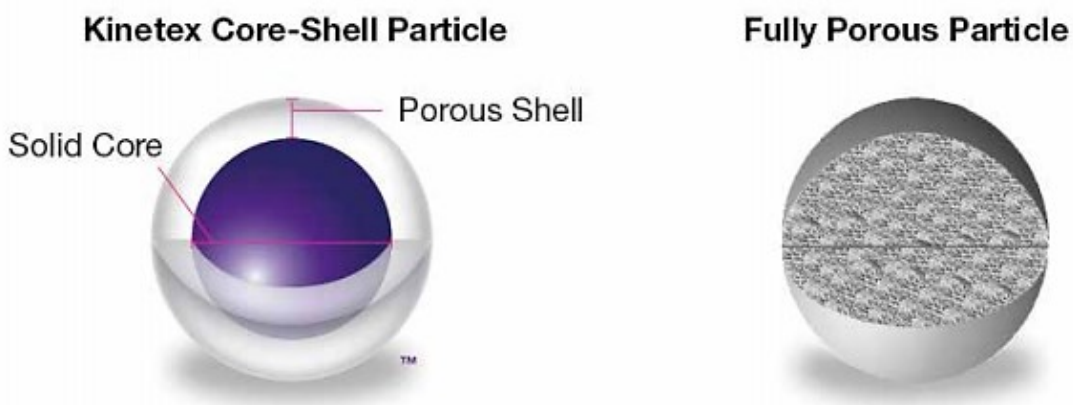
kontrakci, a proto je nutná jeho výroba mimo plášť budoucí kolony a následné utěsnění do tohoto pláště. Další nevýhodou je také nižší chemická a teplotní stabilita silikagelu [66][75].

Monolity na bázi organických polymerů jsou připravovány přímo v prázdné koloně. Pro výrobu je dostupná celá řada organických monomerů (akrylamid, polystyren, methakrylát), díky tomu je možné připravit monolity s rozdílnou selektivitou, ta může být dále ovlivněna modifikací povrchu vzniklého monolitu. Na vlastnosti monolitu má vliv druh a koncentrace složek polymerační směsi, teplota a doba trvání polymerizační reakce. Monolity na bázi organických polymerů jsou často používány k proteomickým analýzám [75].

3.3.3.5 Povrchově porézní částice

Povrchově porézní (PSP), neboli core – shell částice jsou tvořeny pevným jádrem a porézním obalem. Jádro je tvořeno pevným neporézním silikagelem. Průměr jádra je většinou 0,9 – 3,7 μm . Obal je vyroben z chemicky modifikovaného vysoce porézního silikagelu. Velikost částic je v rozmezí 1,3 – 5 μm . Rozdíl ve struktuře PSP a běžné částice je znázorněn na obrázku číslo 13. Hlavní výhodou PSP je jejich vyšší separační účinnost ve srovnání s běžnými částicemi stejné velikosti. Bylo zjištěno, že PSP o velikosti 3 μm mají stejnou separační účinnost jako běžné částice o velikosti pod 2 μm , které ale díky vysokému zpětnému tlaku vyžadují instrumentaci v režimu ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC). Zvýšení separační účinnosti je způsobeno relativně malým průměrem částic, přítomností porézního obalu, pravidelnější distribucí a hustotou naplnění kolony [66][71].

Díky snadným modifikacím silikagelu funkčními skupinami lze PSP využít pro separace v systému normálních, reverzních fází i HILIC. Nevýhodou je nízká teplotní a chemická stabilita silikagelu, ze kterého jsou PSP nejčastěji vyráběny.



Obrázek 13: Porovnání struktury povrchově porézní částice značky Kinetex (vlevo) a běžné částice (vpravo) [76]

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Přístrojové vybavení

HPLC systém LC-20A Prominence, Shimadzu (Kyoto, Japonsko):

- Degaser (DGU-20A5)
- 2 vysokotlaké pumpy (LC-20 AB)
- Zařízení pro dávkování vzorků (autosampler SIL-20AC, Rack Changer)
- Termostat (CTO-20AC)
- Fluorescenční detektor (RF-10AXL)
- Detektor s diodovým polem (SPD-M20A)
- Komunikační modul (CBM-20A)
- Počítač s ovládacím softwarem (LC Solution)

HPLC kolony:

- Gemini C₁₈, 150 x 3,0 mm, 5 µm, Phenomenex (Torrance, USA)
- Kinetex HILIC, 150 x 3,0 mm, 2,6 µm, Phenomenex (Torrance, USA)
- YMC Triart C-18, 150 x 4,6 mm, 3 µm, YMC (Kyoto, Japonsko)
- Dvě spojené monolitické kolony Chromolith RP-18e, 50 x 4,6 mm a 100 x 3,0 mm, s monolitickou předkolumnou 10 x 4,6 mm, MERCK (Darmstadt, Německo)
- Chromolith HighResolution RP-18e, 100 x 4,6 mm, MERCK (Darmstadt, Německo)
- Kinetex Polar C₁₈, 100 x 4,6 mm, 2,6 µm, Phenomenex (Torrance, USA)

- Analytické váhy AG CPA 623S, Sartorius (Göttingen, Německo)
- Mikrocentrifuga D3024R High Speed Refrigerated Micro-Centrifuge, Scilogex (Rocky Hill, USA)
- Manifold Multi-well Filter Plate Vacuum Manifold, Pall Life Science (Ann Arbor, USA)
- Vakuová pumpa Vacc Space 50, Chromservis (Praha, Česká republika)
- pH metr SI600, Sentron (Leek, Nizozemsko)
- Magnetická míchačka, Ika Werke (Staufen im Breisgau, Německo)
- Vortex Lab Dancer, Ika Werke (Staufen im Breisgau, Německo)
- Mikrotitrační destičky s filtry AcroPrep 96 Filter plate 0,2 µm/350 µl, Pall Life Science (Ann Arbor, USA)
- Hydrophilic Polypropylene Membrane Filtres, 47 mm, 0,2 µm, Pall Life Science (Ann Arbor, USA)
- Přístroj pro reverzní osmózu, GORO (Zápy, Česká republika)

4.2 Chemikálie

- Redestilovaná voda (připravena zařízením pro reverzní osmózu)
- Acetonitril pro HPLC, Honeywell (Seelze, Německo)
- Octan amonný $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
- Kyselina chlorovodíková 35% (p.a.), Penta (Praha Česká republika)
- Hydroxid sodný (p.a.), Sigma Aldrich (Praha, Česká republika)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (p.a.), Merck (Darmstadt, Německo)
- Hydrogenfosforečnan draselný (p.a.), Merck (Darmstadt, Německo)

4.3 Standardy

- Neopterin, Sigma Aldrich (Praha, Česká republika)
- Kreatinin, Sigma Aldrich (Praha, Česká republika)

4.4 Příprava roztoků

4.4.1 Příprava zásobních roztoků

Neopterin

Zásobní roztok neopterinu o $c = 39,49 \mu\text{mol/l}$ byl připraven rozpuštěním 1 mg neopterinu v redestilované vodě a doplněním do 100 ml.

Kreatinin

Zásobní roztok kreatininu o $c = 100 \text{ mmol/l}$ byl připraven rozpuštěním 283 mg kreatininu v redestilované vodě a doplněním do 25 ml.

4.4.2 Příprava pracovních roztoků

Neopterin

Pracovní roztoky pro kalibraci neopterinu byly připraveny ředěním zásobního roztoku neopterinu o $c = 39,49 \mu\text{mol/l}$ redestilovanou vodou na $c = 1000 \text{ nmol/l}$, $c = 500 \text{ nmol/l}$, $c = 250 \text{ nmol/l}$, $c = 100 \text{ nmol/l}$ $c = 50 \text{ nmol/l}$ a $c = 10 \text{ nmol/l}$.

Kreatinin

Pracovní roztoky pro kalibraci kreatininu byly připraveny ředěním zásobního roztoku kreatininu o $c = 100 \text{ mmol/l}$ redestilovanou vodou na $c = 50 \text{ mmol/l}$, $c = 25 \text{ mmol/l}$, $c = 10 \text{ mmol/l}$, $c = 5 \text{ mmol/l}$, $c = 2,5 \text{ mmol/l}$ a $c = 1 \text{ mmol/l}$.

Směs standardů

Směs standardů byla připravena smísením 250 μ l pracovního roztoku neopterinu o $c = 500$ nmol/l a 250 μ l pracovního roztoku kreatininu o $c = 10$ mmol/l.

Roztoky byly po přípravě uchovávány v teplotě -27 °C, před použitím byly rozmrazeny při laboratorní teplotě.

4.4.3 Příprava mobilních fází

V této práci byly jako mobilní fáze použity: fosfátový pufr o $c = 15$ mmol/l pH = 4,5; 6,5 a 8,0; fosfátový pufr o $c = 5$ mmol/l pH = 6,5; směs acetonitrilu s octanem amonným o $c = 10$ mmol/l pH = 4,0 a 6,0 v poměru 90:10.

Zásobní roztok fosfátového pufru o $c = 1$ mol/l byl připraven rozpuštěním 102,0 g KH_2PO_4 a 57,1 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ v redestilované vodě a doplněním do 1000 ml.

Roztok fosfátového pufru o $c = 15$ mmol/l byl připraven naředěním 15 ml zásobního roztoku redestilovanou vodou a doplněním do 1000 ml. Následně byl připravený roztok rozdělen na tři díly a pomocí HCl a NaOH bylo upraveno pH na hodnoty 4,5; 6,5 a 8,0.

Roztok fosfátového pufru o $c = 5$ mmol/l byl připraven naředěním 5 ml zásobního roztoku redestilovanou vodou a doplněním do 1000 ml. Následně bylo pomocí HCl a NaOH upraveno pH připraveného roztoku na hodnotu 6,5.

Roztok octanu amonného o $c = 10$ mmol/l byl připraven rozpuštěním 77 mg octanu amonného v redestilované vodě a doplněním do 100 ml. Následně byl připravený roztok rozdělen na dva díly a pomocí HCl a NaOH bylo upraveno pH na hodnoty 4,0 a 6,0.

Všechny mobilní fáze byly přefiltrovány pomocí filtrů s póry o velikosti 0,2 μ m.

4.5 Odběr a příprava vzorků

Biologickým materiálem využívaným pro stanovení byla moč pacientů odebraná metodou středního proudu první ranní moči. Po odběru bylo moč nutné co nejrychleji (do jedné hodiny) transportovat do laboratoře. Při transportu musel být vzorek chráněn před světlem (neopterin je fotolabilní). Zkumavka s močí musí být vždy řádně označena a doprovázena průvodkou, na které jsou uvedeny další informace (diagnóza, jméno lékaře indikující vyšetření). Pokud moč nebyla ihned zpracována, byla uložena při teplotě -20 °C (stabilita 3 týdny), v případě delšího skladování při teplotě -80 °C.

Moč byla před analýzou rozmrazena při laboratorní teplotě a centrifugována na mikrocentrifuze při 14000 x g po dobu 45 sekund. Do zkumavky bylo odebráno 100 µl supernatantu a přidáno 1000 µl fosfátového pufru o c = 15 mmol/l a pH 6,5. Při využití metody HILIC bylo ředění vzorku provedeno 1000 µl směsi acetonitrilu s octanem amonným o c = 10 mmol/l a pH 4,0 v poměru 90:10. Následně byl obsah zkumavky důkladně promíchán na třepačce. Přes filtr s póry o velikosti 0,2 µm bylo do mikrotitrační destičky pipetováno 170 µl naředěné moči.

4.6 Vlastní analýza

Při vypracování této diplomové práce bylo vycházeno z HPLC metody, která byla vyvinuta pracovníky Výzkumné laboratoře ÚKBD FN HK. Analýza byla prováděna na kapalinovém chromatografu Prominence LC 20A. Tato metoda využívala kolonu Gemini C₁₈ (150 x 3,0 mm, 5 µm). Mobilní fáze byla tvořena fosfátovým pufrem o c = 15 mmol/l a pH 6,5. Analýza probíhala v isokratickém režimu při teplotě 25 °C. Vzorek byl dávkován v objemu 1 µl. Detekce neopterinu probíhala pomocí fluorescenčního detektoru (FD) při následujících vlnových délkách: excitační 353 nm a emisní 438 nm. Kreatinin byl detekován pomocí detektoru s diodovým polem (PDA) při vlnové délce 235 nm.

V rámci vypracování této práce bylo kromě výše uvedené kolony testováno ještě dalších pět kolon: Kinetex HILIC (150 x 3,0 mm, 2,6 µm), YMC Triart C-18 (150 x 4,6 mm, 3 µm), dvě spojené monolitické kolony Chromolith RP-18e s monolitickou předkolonou (50 x 4,6 mm, 100 x 3,0 mm a 10 x 4,6 mm), Chromolith HighResolution RP-18e (100 x 4,6 mm) a Kinetex Polar C₁₈ (100 x 4,6 mm, 2,6 µm). Testování bylo prováděno nejprve na směsi standardů a následně na vzorcích moči. Pro některé z těchto kolon byla výše uvedená metoda modifikována, změny jsou uvedeny níže.

Pro testování kolony Kinetex HILIC (150 x 3,0 mm 2,6 µm) byla jako mobilní fáze použita směs acetonitrilu s octanem amonným o c = 10 mmol/l v poměru 90:10. Nejprve byla provedena analýza s octanem amonným o pH 6,0; následně bylo upraveno na pH 4.

Kolona YMC Triart C-18 (150 x 4,6 mm, 3 µm) byla testována s fosfátovým pufrem jako mobilní fází. Byl použit fosfátový pufr o c = 15 mmol/l a pH 4,5; 6,5 a 8,0. Následně byl použit fosfátový pufr o c = 5 mmol/l a pH 6,5.

Zbylé kolony byly testovány za podmínek shodných s původní metodou.

4.7 Parametry použité k vyhodnocení

4.7.1 Opakovatelnost nástřiku

Opakovatelnost nástřiku je jedním z parametrů, které popisují přesnost metody. Vyjadřuje míru shody mezi výsledky měření jednoho a téhož vzorku, které probíhá za stejných podmínek. Vyjadřuje se v procentech jako hodnota relativní směrodatné odchylky (RSD) retenčního času a plochy píku analytu. Dle doporučení U. S. Food and Drug Administration (FDA) by hodnota RSD neměla překročit 1 % [77][78].

Výpočet se provádí dle vzorce:

$$\text{RSD [\%]} = \frac{100}{\bar{y}} \cdot \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}}$$

y_i – naměřené hodnoty

\bar{y} – průměr naměřených hodnot

n – počet naměřených hodnot

4.7.2 Rozlišení

Parametr rozlišení (R_s) popisuje kvalitu separace dvou sousedních píků. Čím vyšší je hodnota tohoto parametru, tím lépe jsou od sebe píky separovány. Hodnota R_s 1,5 vyjadřuje separaci píků na základní linii [66].

Výpočet se provádí dle vzorce:

$$R_s = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{(w_{h1} + w_{h2})}$$

t_{R1} a t_{R2} – retenční časy píků

w_{h1} a w_{h2} – šířky píků v poloviční výšce

4.7.3 Symetrie píků

Faktor symetrie (A_s) slouží k zhodnocení symetrie píku. Hodnota 1 odpovídá plně symetrickému píku. Při hodnotách vyšších než 1 dochází ke chvostování píku, naopak při hodnotách nižších než 1 se jedná o čelní asymetrii píku (pozdvolný náběh). Dle Českého lékopisu by měla být hodnota A_s v rozmezí 0,8 – 1,5 [67].

Výpočet se provádí dle vzorce:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

$w_{0,05}$ – šířka píku v jedné dvacetině výšky

d – vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky

4.7.4 Účinnost kolony

Účinnost chromatografické kolony je vyjádřena jako počet teoretických pater (N). Tato veličina udává míru rozšiřování elučních zón dělených na koloně a ukazuje tedy kvalitu chromatografické separace. Počet teoretických pater závisí kromě využití kolony na stanovovaném analytu a jeho retenčním čase, teplotě, použité mobilní fázi i na rychlosti jejího průtoku. Čím vyšší je hodnota, tím lepší je separační účinnost. Dle doporučení FDA by hodnota N měla být více než 2000 [66][67][78].

Výpočet se provádí dle vzorce:

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

t_R – retenční čas píku

w_h – šířka píku v polovině výšky

Výškový ekvivalent teoretického patra (HETP) je definován jako délka kolony připadající na jedno patro. Slouží k porovnání účinnosti kolon různých délek [66].

Výpočet se provádí dle vzorce:

$$\text{HETP } [\mu\text{m}] = \frac{L \cdot 1000}{N}$$

L – délka kolony [mm]

N – počet teoretických pater

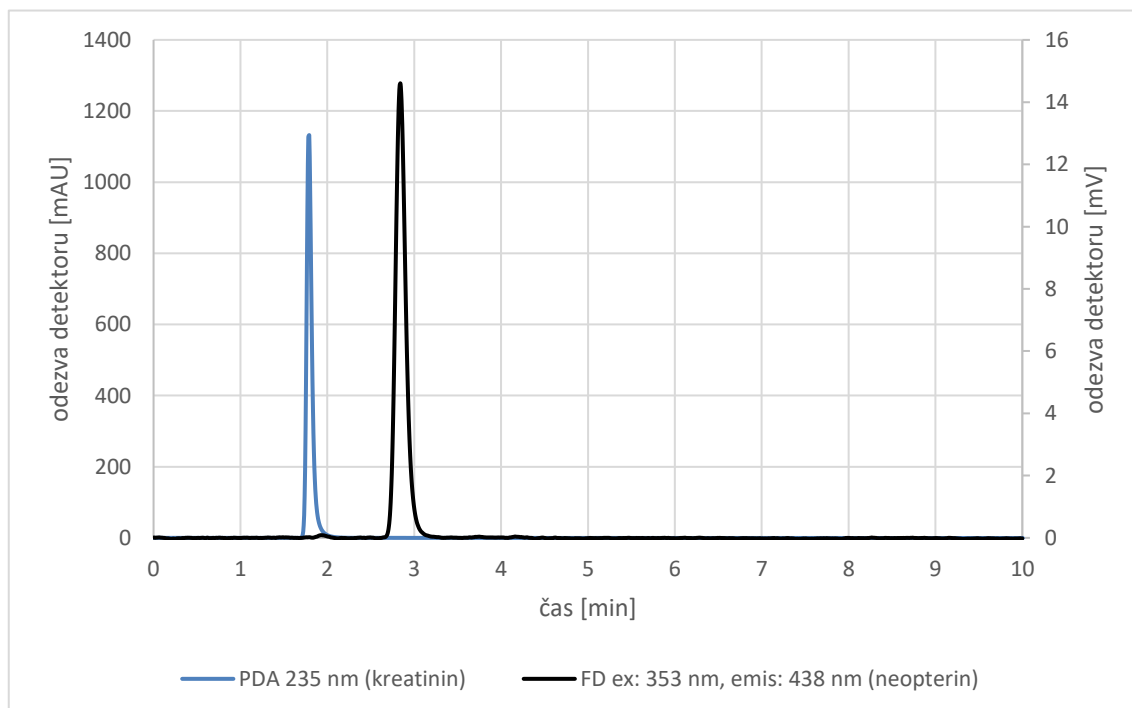
5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Výběr separačních podmínek

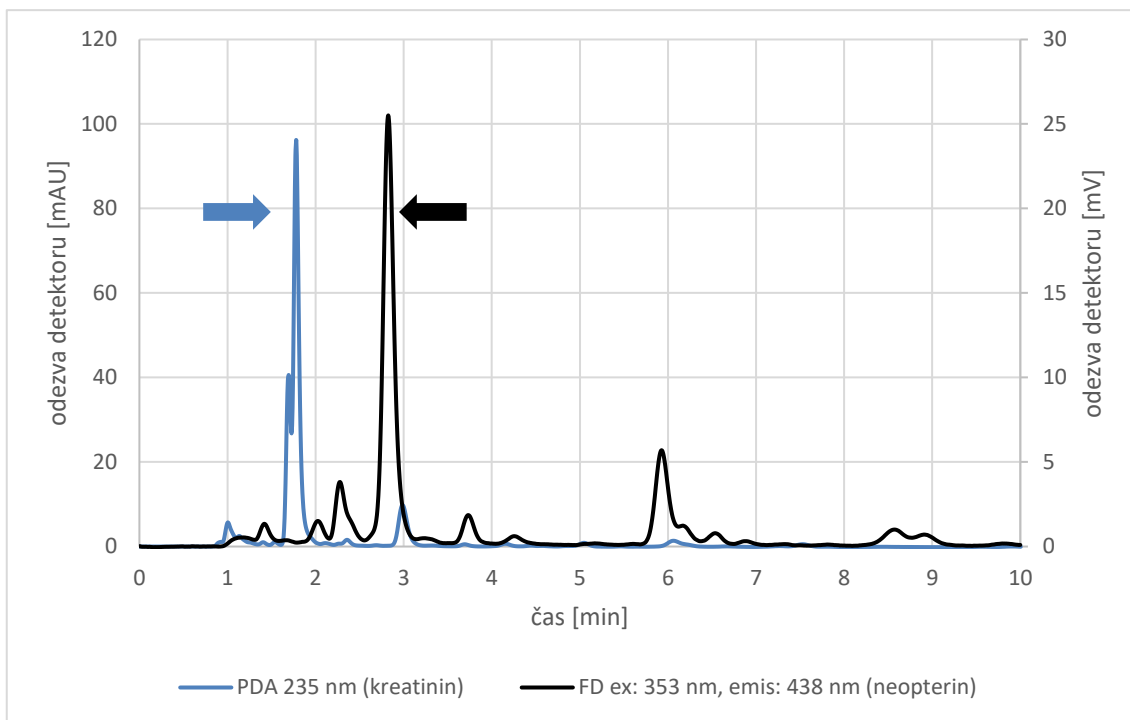
Cílem práce bylo vybrat vhodnou chromatografickou kolonu, pro již zavedenou metodu. Při výběru separačních podmínek bylo vycházeno z této metody. U některých kolon bylo optimalizováno složení mobilní fáze. Koncentrace standardů ve směsi byla vždy stejná: neopterin $c = 250 \text{ nmol/l}$ a kreatinin $c = 5 \text{ mmol/l}$. Chromatogramy biologického materiálu byly získány testováním různých vzorků moči.

5.1.1 Gemini C₁₈, 150 x 3,0 mm, 5 μm

Stacionární fáze této kolony je tvořena hybridními částicemi, které jsou modifikovány navázáním C₁₈ řetězců. Jedná se o kolonu, která byla použita v původní validované metodě pro stanovení neopterinu a kreatininu v moči. Po dlouhodobém výpadku ve výrobě a následném zakoupení nové šarže kolony došlo po analýze menší série vzorků ke ztrátě jejich separačních vlastností. I po testování kolony z jiné šarže nebylo dosaženo původních výsledků. Do této práce byla kolona zařazena pro ověření, zda tento problém stále přetrvává. Analýza byla prováděna se stejnou mobilní fází jako původní metoda, tedy s fosfátovým pufrům o koncentraci $c = 15 \text{ mmol/l}$ a pH 6,5. V prvních nástřicích byly výsledky u směsi standardů i vzorků uspokojivé, chromatogramy jsou zobrazeny na obrázcích číslo 14 a 15. Průtok mobilní fáze byl do 4. minuty 0,8 ml/min a od 4. minuty 1 ml/min. Retenční čas kreatininu ve směsi standardů byl 1,89 min. a ve vzorku moči také 1,89 min. Retenční čas neopterinu byl ve směsi standardů 3,10 min. a ve vzorku moči 3,12 min. Doba analýzy byla 10 minut.

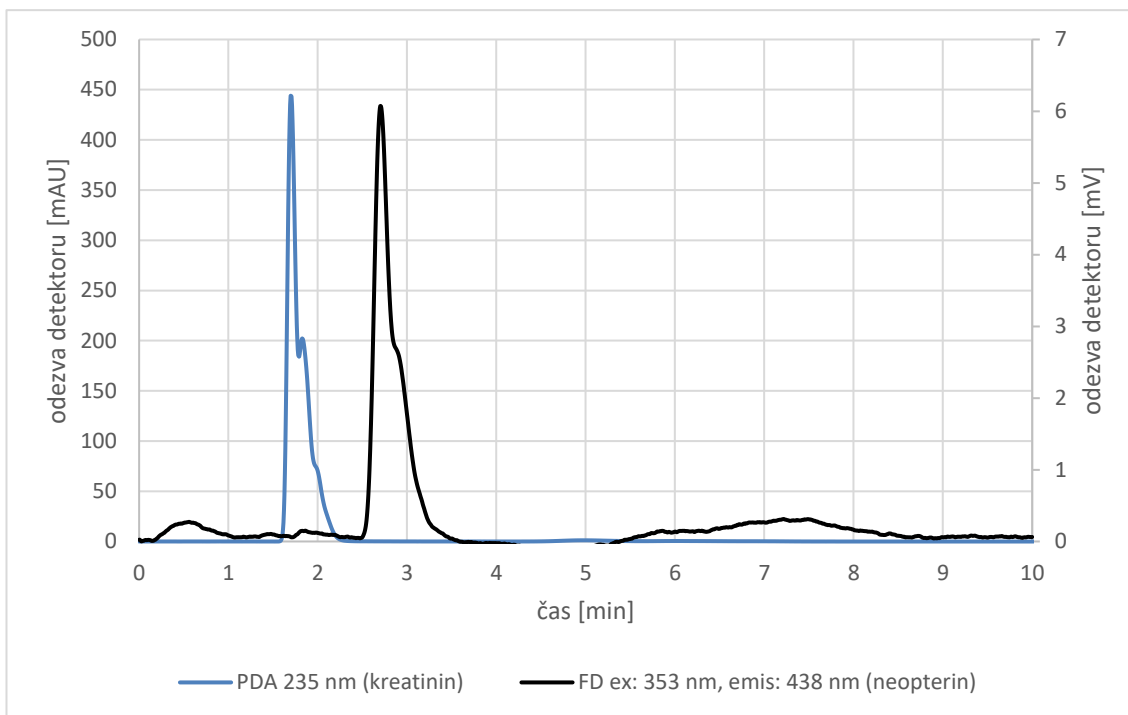


Obrázek 14: Chromatogram směsi standardů, kolona Gemini C₁₈, 150 x 3,0 mm, 5 μm, objem nástřiku 1 μl, (mobilní fáze: fosfátový pufr o $c = 15 \text{ mmol/l}$, pH = 6,5, průtok 0 – 4 min: 0,8 ml/min, 4 – 10 min: 1 ml/min)

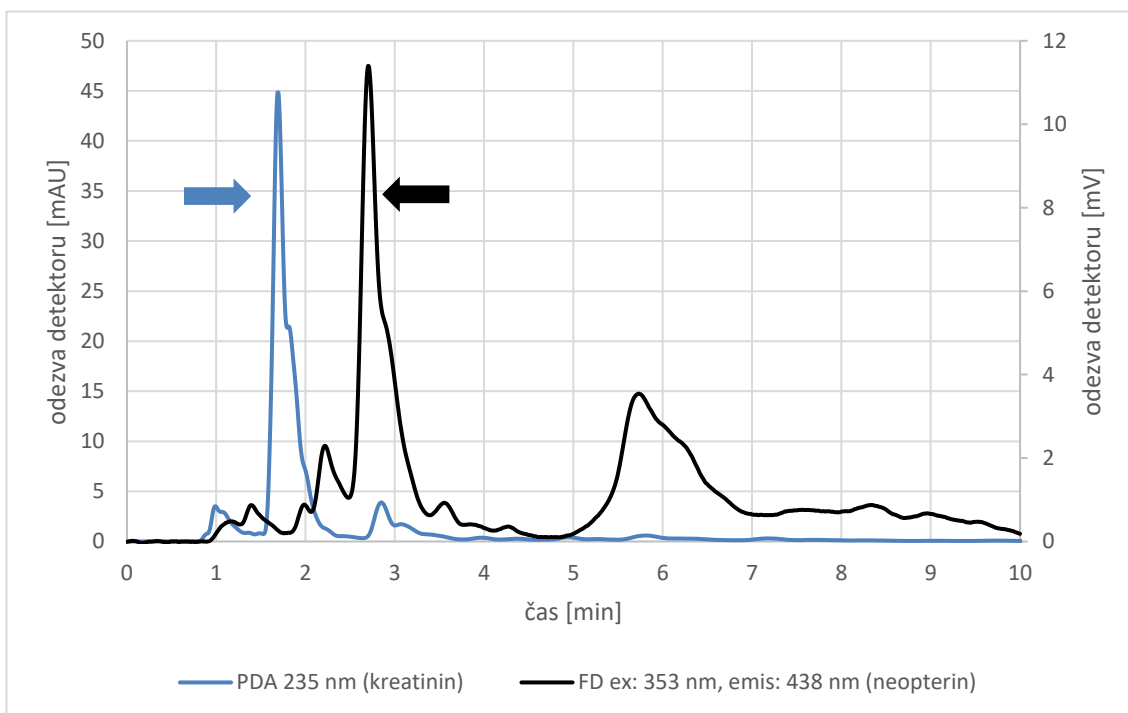


Obrázek 15: Chromatogram moči, kolona Gemini C₁₈, 150 x 3,0 mm, 5 μm, objem nástřiku 1 μl, (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5, průtok 0 – 4 min: 0,8 ml/min, 4 – 10 min: 1 ml/min), píky analytů označeny šipkami

U této kolony byla analýza vzorků provedena třicetkrát a následně byla znovu analyzována směs standardů. Bylo prokázáno, že s rostoucím počtem analýz dochází k deformaci tvaru píků. Chromatogramy stanovení směsi standardů a moči po analýze 30 vzorků jsou uvedeny na obrázcích číslo 16 a 17.

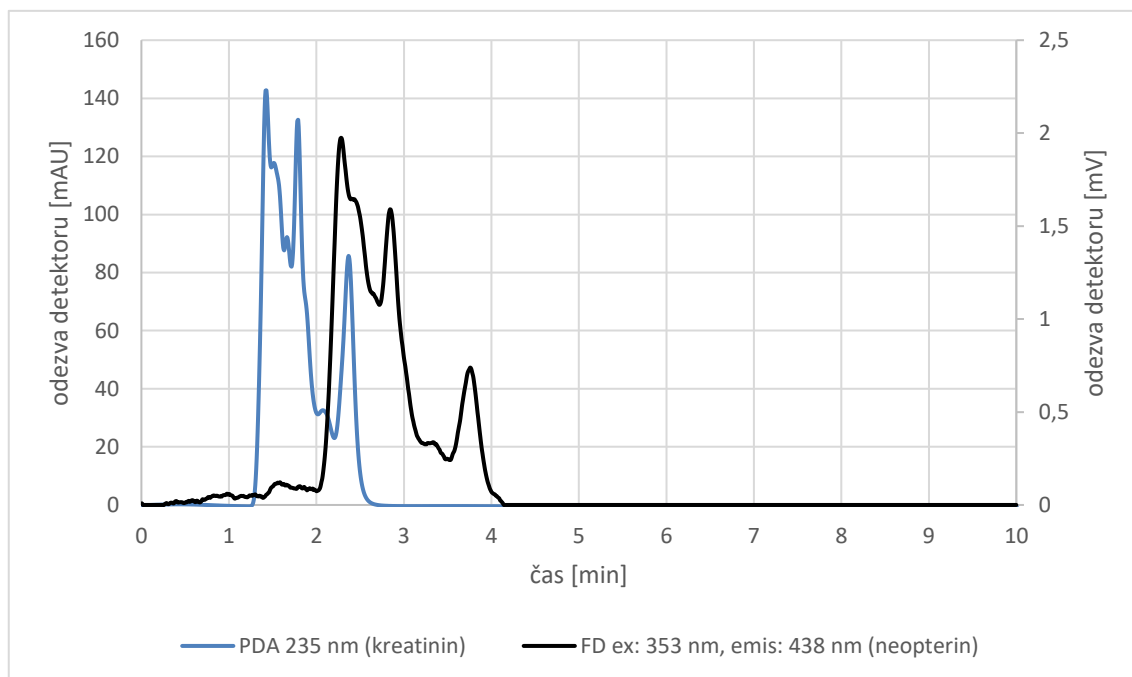


Obrázek 16: Chromatogram směsi standardů po analýze 30 vzorků, kolona Gemini C₁₈, 150 x 3,0 mm, 5 μm, objem nástřiku 1 μl, (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5, průtok 0 – 4 min: 0,8 ml/min, 4 – 10 min: 1 ml/min)

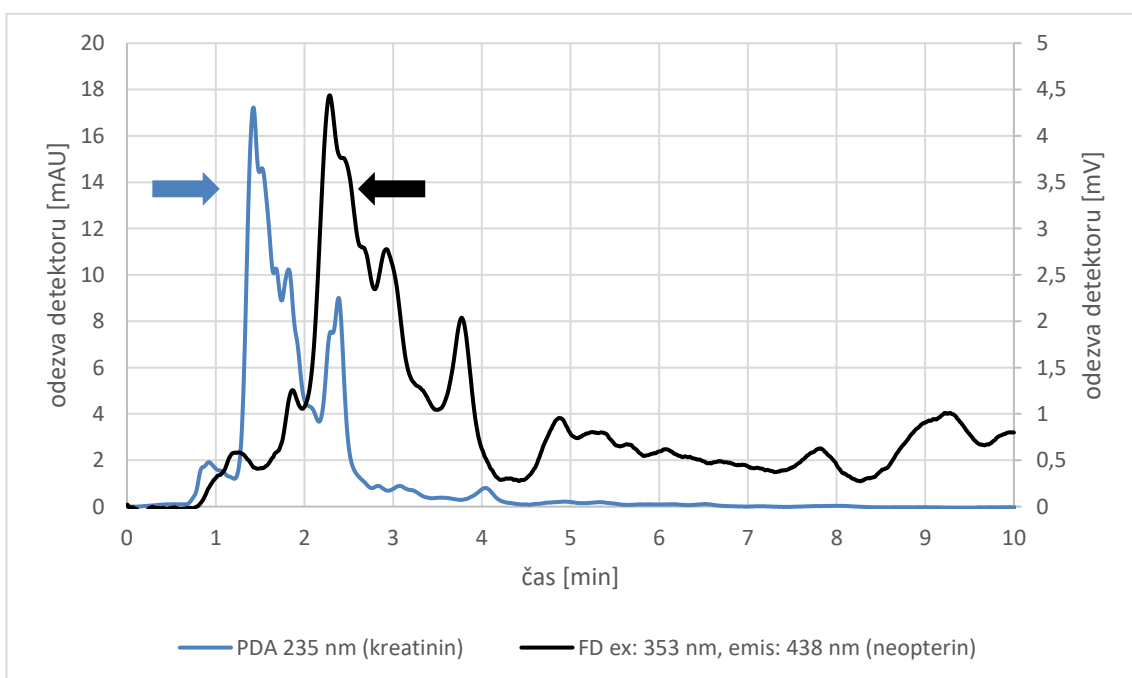


Obrázek 17: Chromatogram moči po analýze 30 vzorků, kolona Gemini C₁₈, 150 x 3,0 mm, 5 μm, objem nástřiku 1 μl, (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5, průtok 0 – 4 min: 0,8 ml/min, 4 – 10 min: 1 ml/min), píky analytů označeny šipkami

Po analýze 60 vzorků došlo ke ztrátě separačních vlastností kolony a tvar píků byl výrazně deformovaný, což je zobrazeno na obrázcích číslo 18 a 19.



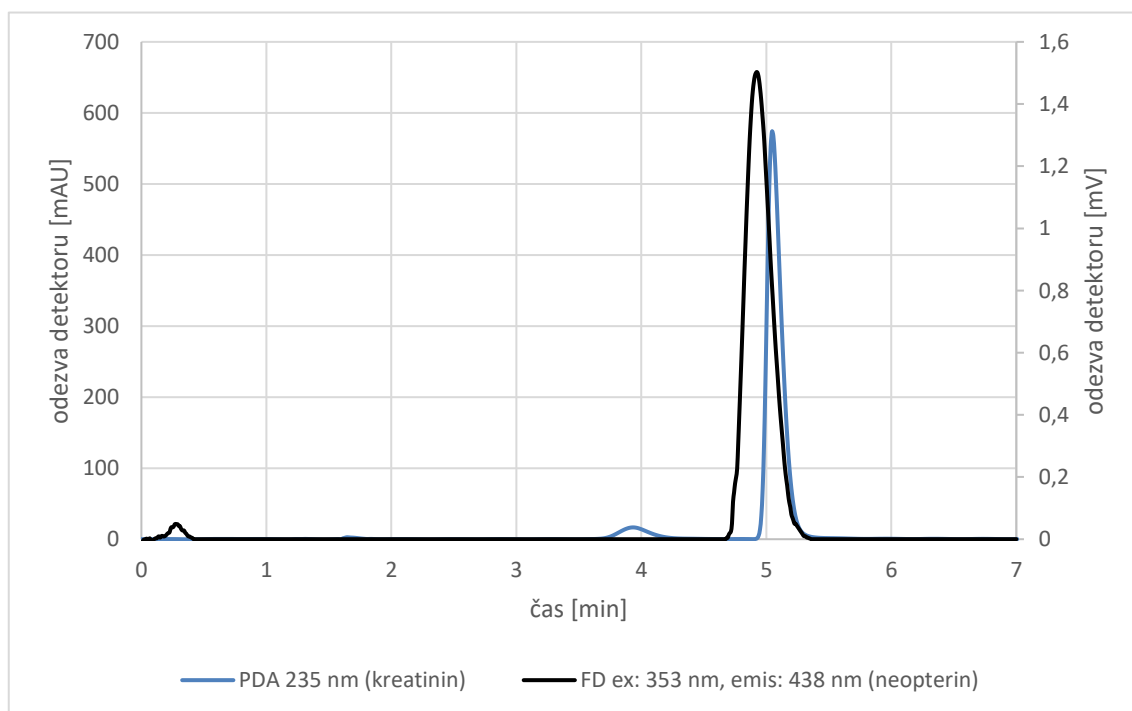
Obrázek 18: Chromatogram směsi standardů po analýze 60 vzorků, kolona Gemini C₁₈, 150 x 3,0 mm, 5 μm, objem nástřiku 1 μl, (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5, průtok 0 – 4 min: 0,8 ml/min, 4 – 10 min: 1 ml/min)



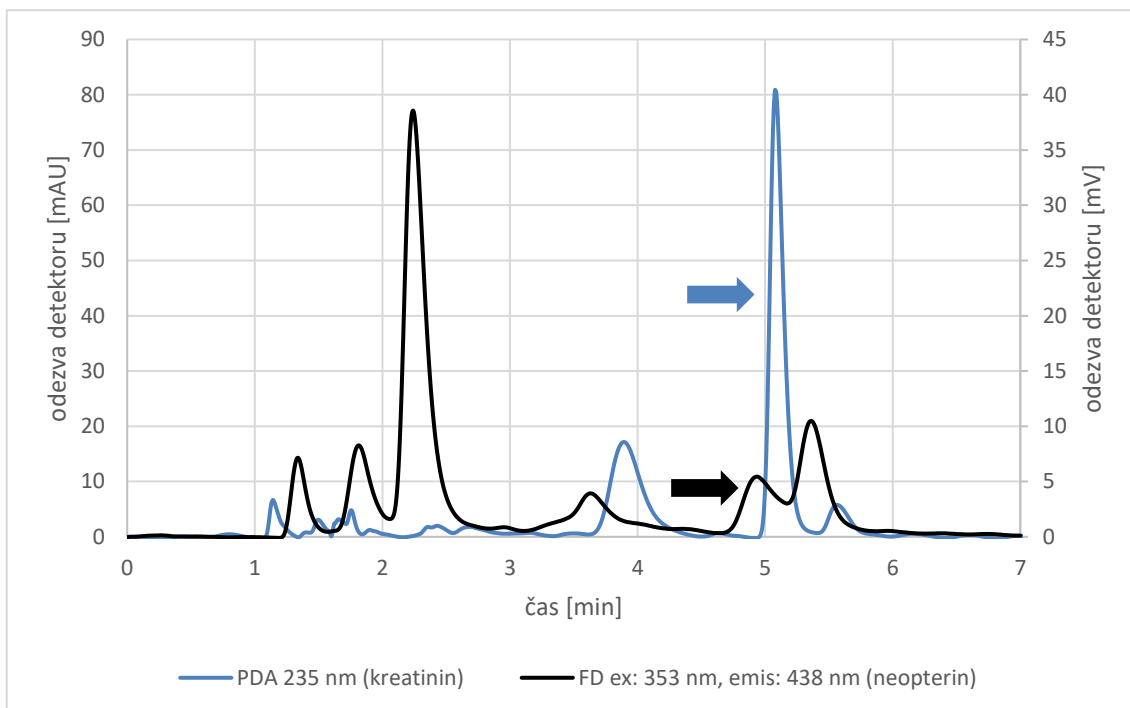
Obrázek 19: Chromatogram moči po analýze 60 vzorků, kolona Gemini C₁₈, 150 x 3,0 mm, 5 μm, objem nástřiku 1 μl, (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5, průtok 0 – 4 min: 0,8 ml/min, 4 – 10 min: 1 ml/min), píky analytů označeny šipkami

5.1.2 Kinetex HILIC, 150 x 3,0 mm, 2,6 µm

Stacionární fáze této kolony je tvořena silikagelovými povrchově porézními částicemi. Jedná se o kolonu využívající k separaci princip HILIC, proto bylo nutné změnit mobilní fázi oproti původní metodě. Dle informací uvedených v literatuře byla jako mobilní fáze vybrána směs acetonitrilu a octanu amonného o koncentraci $c = 10 \text{ mmol/l}$ v poměru 90:10. Na základě vlastností analytů bylo vybráno pH 6,0, při tomto pH ale nedošlo k uspokojivým výsledkům analýzy, problémem byla především šířka píků. Proto bylo pH mobilní fáze upraveno na hodnotu 4,0. Při využití této mobilní fáze byl již průběh analýzy směsi standardů uspokojivý a bylo přistoupeno k analýze moči. Vzorek moči nebyl ředěn fosfátovým pufrům jako u ostatních testovaných kolon, ale směsí acetonitrilu a octanu amonného o koncentraci $c = 10 \text{ mmol/l}$ v poměru 90:10. Při analýze moči ale nedošlo k dostatečnému oddělení píku neopterinu od přítomné nečistoty. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min. Retenční čas kreatininu ve směsi standardů byl 5,06 min. a ve vzorku moči 5,07 min. Retenční čas neopterinu byl ve směsi standardů 4,73 min. a ve vzorku moči 4,86 min. Doba analýzy byla 7 minut. Chromatogram směsi standardů je zobrazen na obrázku číslo 20, analýza moči na obrázku číslo 21.



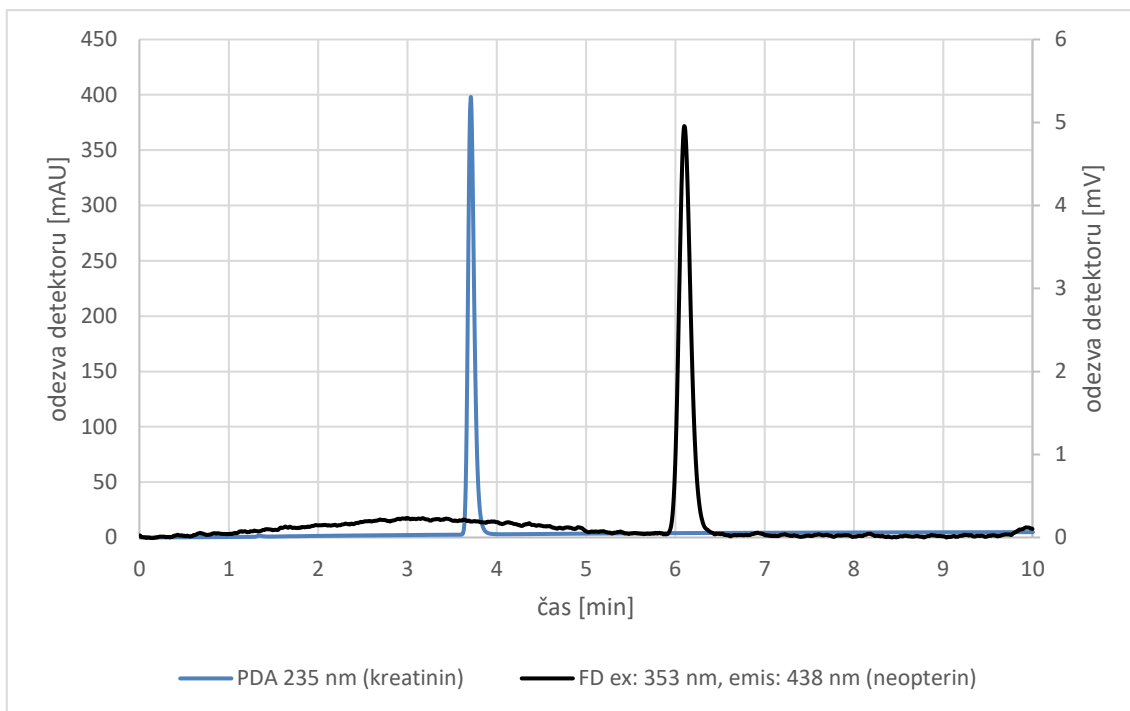
Obrázek 20: Chromatogram směsi standardů, kolona Kinetex HILIC, 150 x 3,0 mm, 2,6 µm, objem nástřiku 1 µl, (mobilní fáze: acetonitril, octan amonný o $c = 10 \text{ mmol/l}$, pH = 4,0 90:10, průtok 0,5 ml/min)



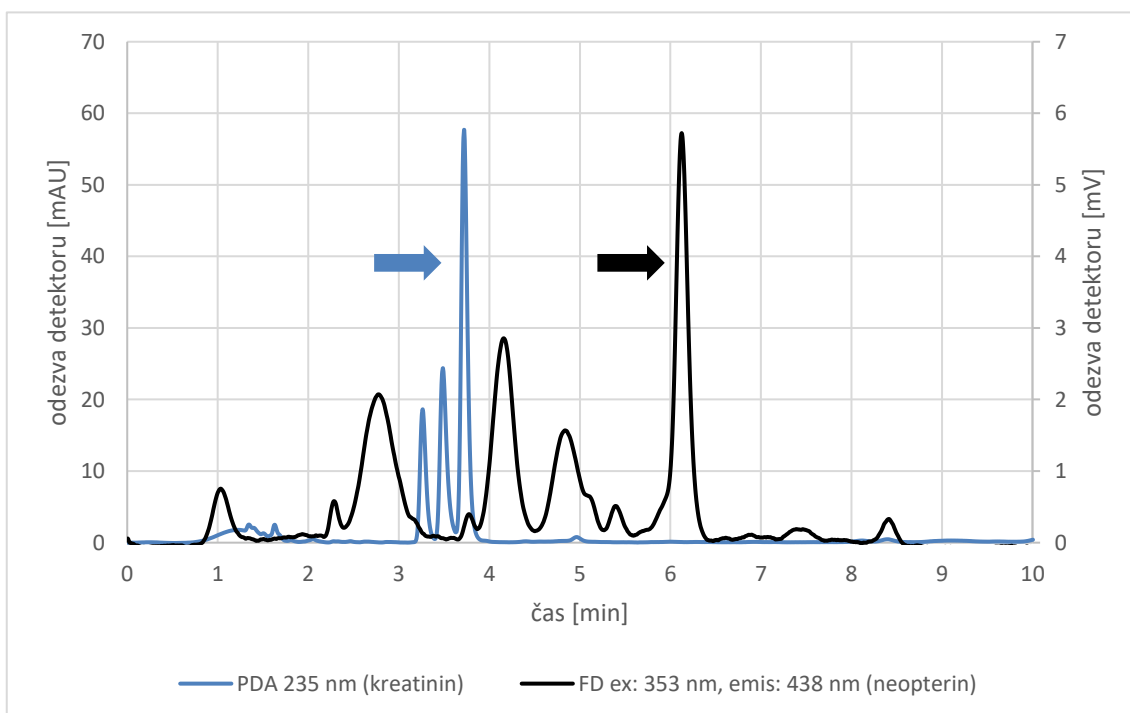
Obrázek 21: Chromatogram moči, kolona Kinetex HILIC, 150 x 3,0 mm, 2,6 μ m, objem nástřiku 1 μ l, (mobilní fáze: acetonitril, octan amonný o c = 10 mmol/l, pH = 4, 90:10, průtok 0,5 ml/min), píky analytů označeny šipkami

5.1.3 YMC Triart C-18, 150 x 4,6 mm, 3 μ m

Stacionární fáze této kolony je tvořena částicemi z hybridního materiálu, které jsou modifikovány navázáním C_{18} řetězců. Díky tomu, že testovaná kolona využívá princip separace na RP stejně jako kolona, pro kterou byla původní metoda validována, bylo rozhodnuto o využití fosfátového pufru jako mobilní fáze. Bylo optimalizováno pH separace, kdy nejlepších separačních výsledků bylo dosaženo při pH 6,5. Hodnoty pH 4,5 ani pH 8,0 se neosvědčily. Stanovení bylo prováděno s pufrem o koncentraci $c = 15$ mmol/l, při této koncentraci bylo dosaženo uspokojivých výsledků jak při separaci směsi standardů, tak i při analýze moči. Chromatogramy jsou zobrazeny na obrázcích číslo 22 a 23. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Retenční čas kreatininu ve směsi standardů byl 3,71 min. a ve vzorku moči 3,74 min. Retenční čas neopterinu byl ve směsi standardů 6,10 min. a ve vzorku moči 6,19 min. Doba analýzy byla 10 minut.

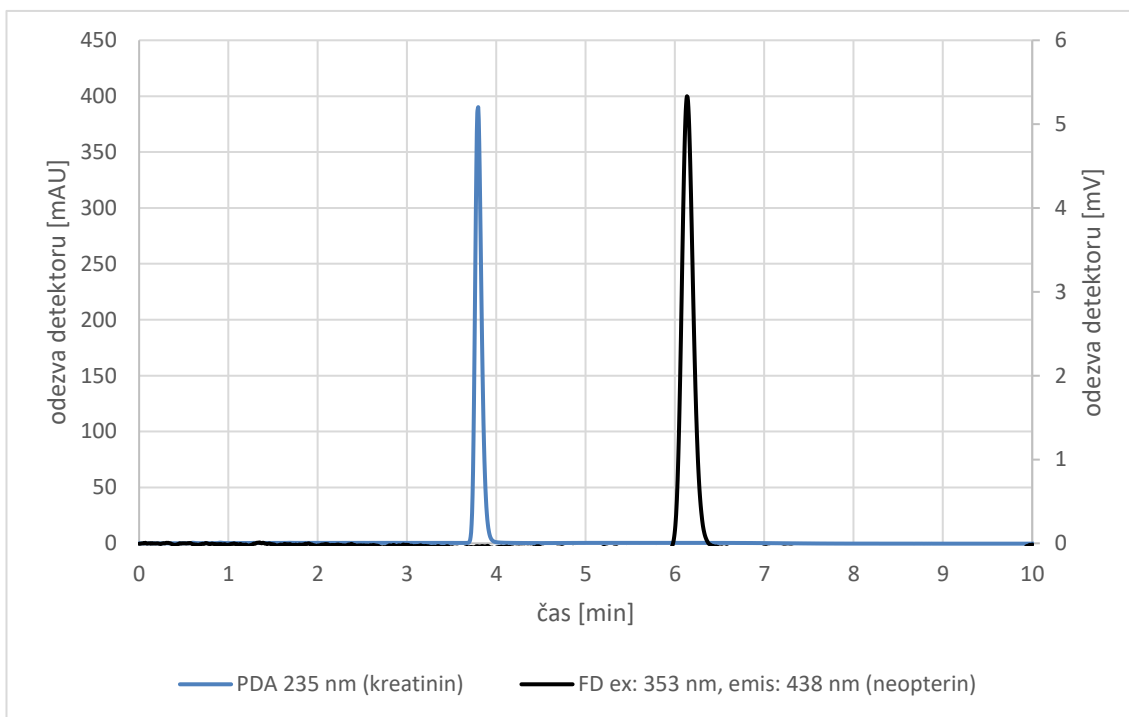


Obrázek 22: Chromatogram směsi standardů, kolona YMC Triart C-18, 150 x 4,6 mm, 3 μ m, objem nástřiku 1 μ l, (mobilní fáze: fosfátový pufr o $c = 15$ mmol/l, pH = 6,5, průtok 1 ml/min)

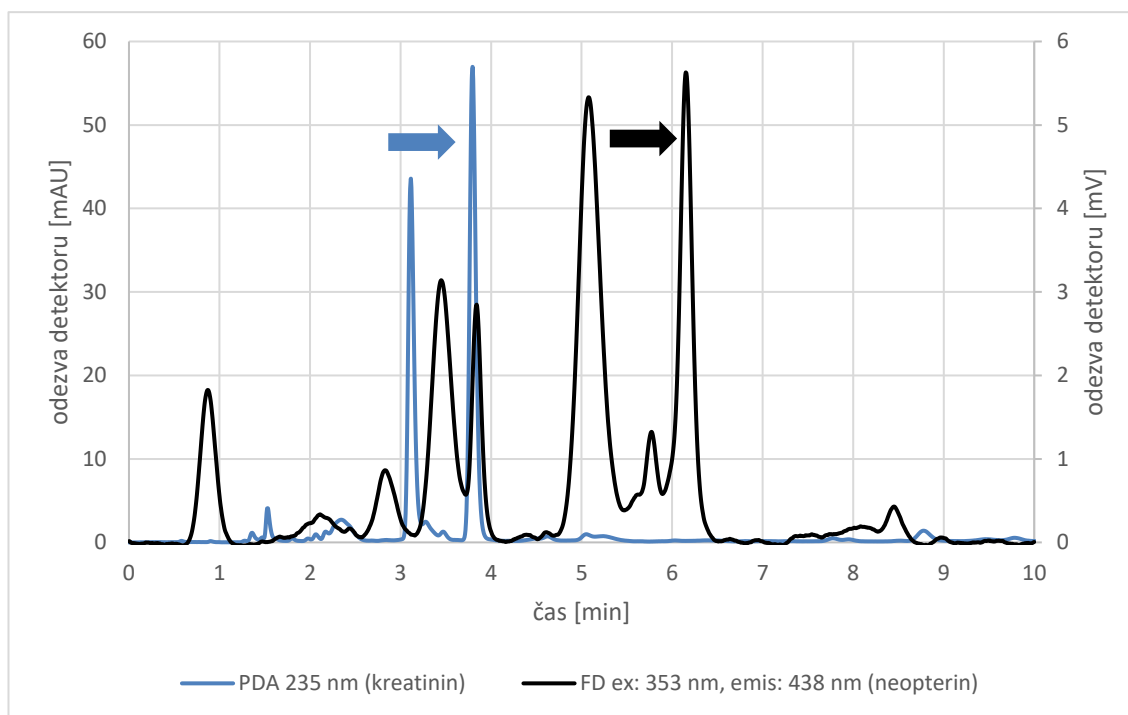


Obrázek 23: Chromatogram moči, kolona YMC Triart C-18, 150 x 4,6 mm, 3 μ m, objem nástřiku 1 μ l, (mobilní fáze: fosfátový pufr o $c = 15$ mmol/l, pH = 6,5, průtok 1 ml/min), píky analytů označeny šipkami

Následně bylo testováno snížení koncentrace pufru na $c = 5 \text{ mmol/l}$, pH zůstalo stejné: 6,5. Při této koncentraci došlo k získání uspokojivých výsledků při analýze směsi standardů, chromatogram je na obrázku číslo 24. Při analýze moči ale neopterin nebyl dostatečně separován od přítomné nečistoty, chromatogram je na obrázku číslo 25. Retenční čas kreatininu ve směsi standardů byl 3,79 min. a ve vzorku moči 3,76 min. Retenční čas neopterinu byl ve směsi standardů 6,14 min. a ve vzorku moči 6,16 min. Průtok mobilní fáze i doba analýzy zůstali stejné.



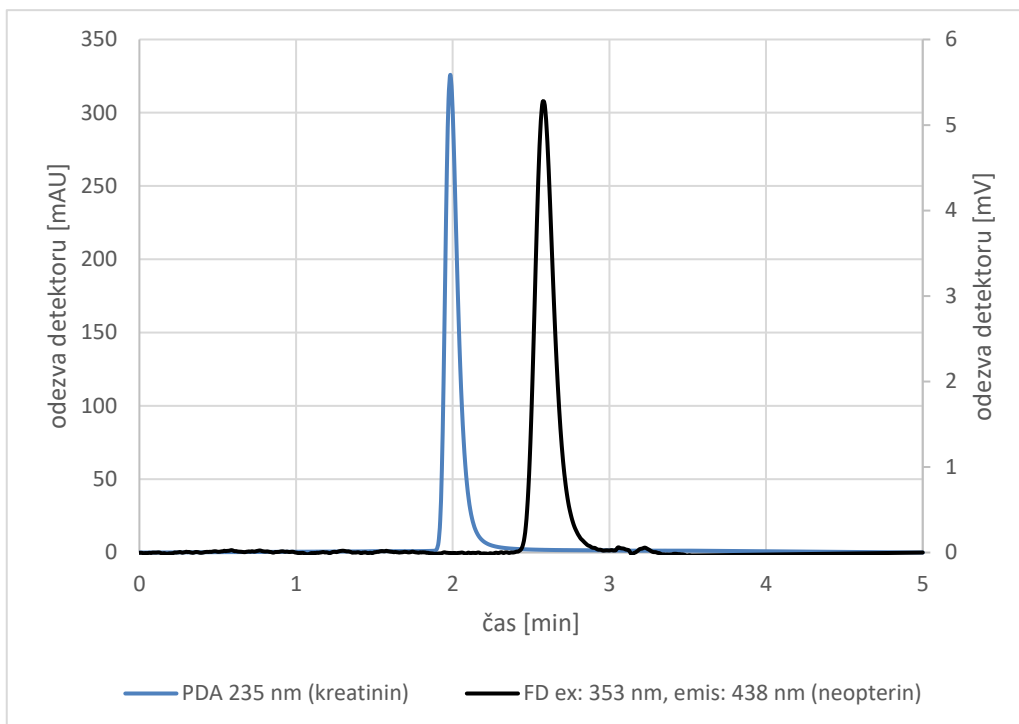
Obrázek 24: Chromatogram směsi standardů, kolona YMC Triart C-18, 150 x 4,6 mm, 3 μm , objem nástřiku 1 μl , (mobilní fáze: fosfátový pufr o $c = 5 \text{ mmol/l}$, pH = 6,5, průtok 1 ml/min)



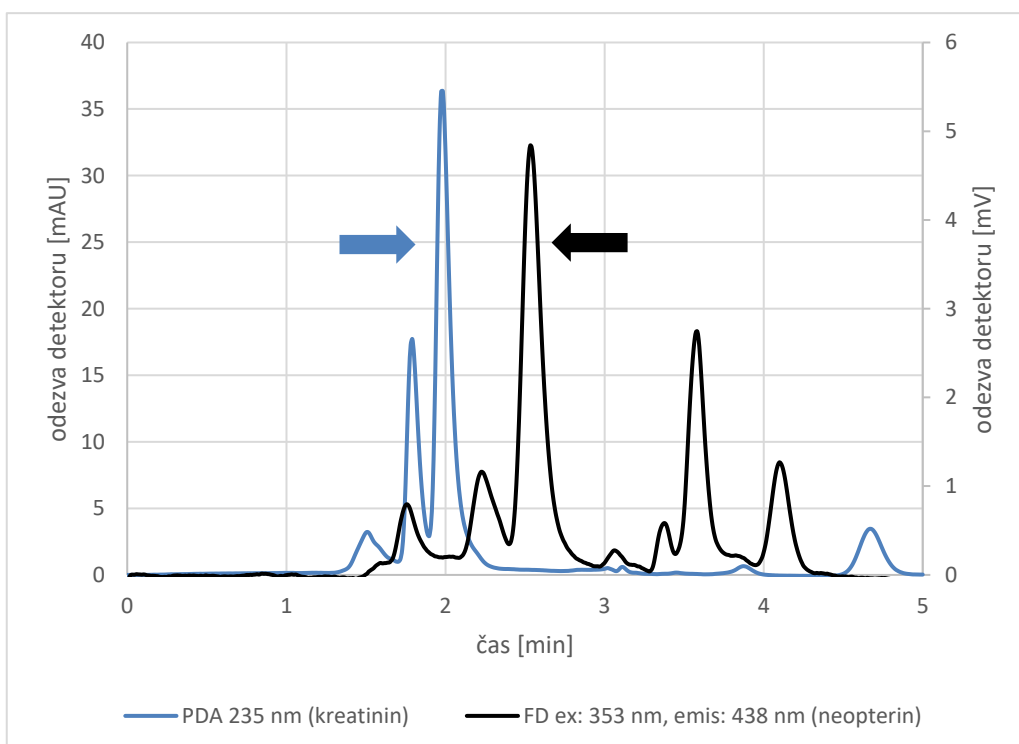
Obrázek 25: Chromatogram moči, kolona YMC Triart C-18, 150 x 4,6 mm, 3 μ m, objem nástřiku 1 μ l, (mobilní fáze: fosfátový pufr o $c = 5$ mmol/l, pH = 6,5, průtok 1 ml/min), píky analytů označeny šipkami

5.1.4 Spojené kolony Chromolith RP-18e, 50 x 4,6 mm a 100 x 3,0 mm

Stacionární fáze těchto kolon se skládá ze silikagelového monolitu, který je modifikován navázáním C_{18} řetězců, volné silanolové skupiny jsou chráněny endcappingem. Takto spojené kolony byly do práce zahrnuty díky dobrým zkušenostem s jejich využitím pro stanovení neopterinu a kreatininu v séru v laboratoři ÚKBD FN HK [19]. Analýza byla prováděna se stejnou mobilní fází jako původní metoda, tedy s fosfátovým pufrům o koncentraci $c = 15$ mmol/l a pH 6,5. Poměrně dobrých výsledků bylo dosaženo při separaci směsi standardů, je zde ale patrné rozšíření píky neopterinu oproti ostatním kolonám. Chromatogram je na obrázku číslo 26. Při analýze moči nedošlo k úplnému oddělení píky kreatininu ani neopterinu od přítomné nečistoty, což je zobrazeno na obrázku číslo 27. Průtok mobilní fáze byl do 3. minuty 1 ml/min a od 3. minuty 3,5 ml/min. Retenční čas kreatininu ve směsi standardů byl 1,98 min. a ve vzorku moči 1,97 min. Retenční čas neopterinu byl ve směsi standardů 2,58 min. a ve vzorku moči 2,55 min. Doba analýzy byla 5 minut.



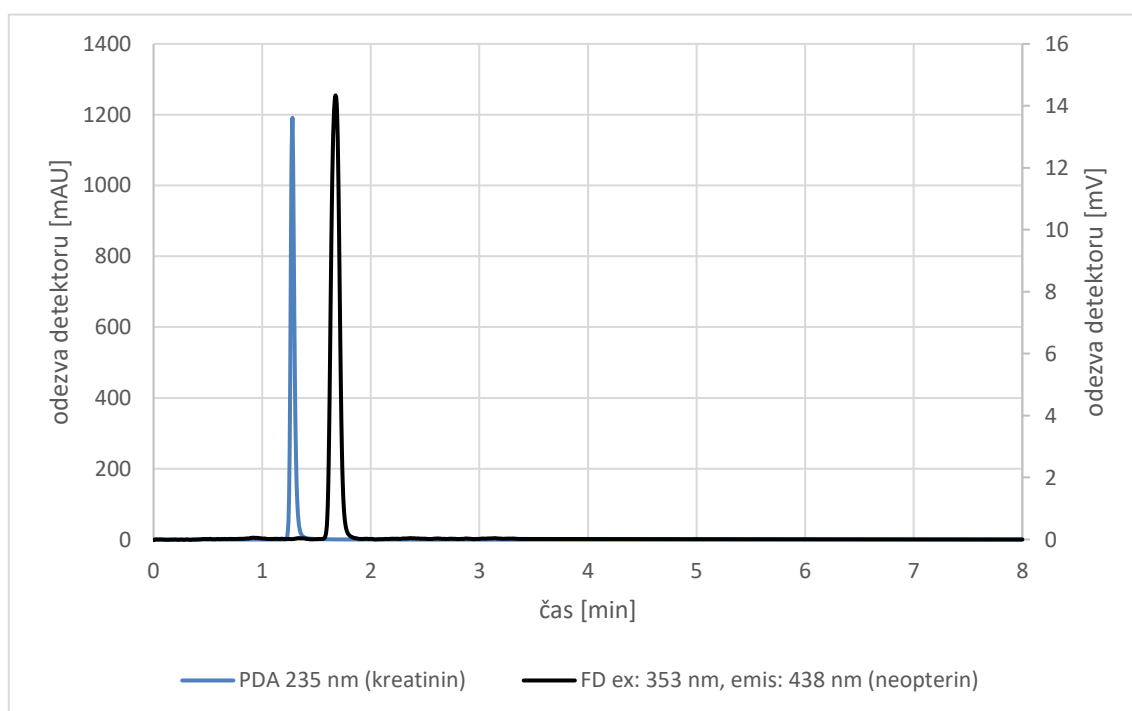
Obrázek 26: Chromatogram směsi standardů, spojené kolony Chromolith RP-18e, 50 x 4,6 mm a 100 x 3,0 mm, objem nástřiku 1 μ l, (mobilní fáze: fosfátový pufr o $c = 15$ mmol/l, pH = 6,5, průtok 0 – 3 min: 1 ml/min, 3 – 5 min: 3,5 ml/min)



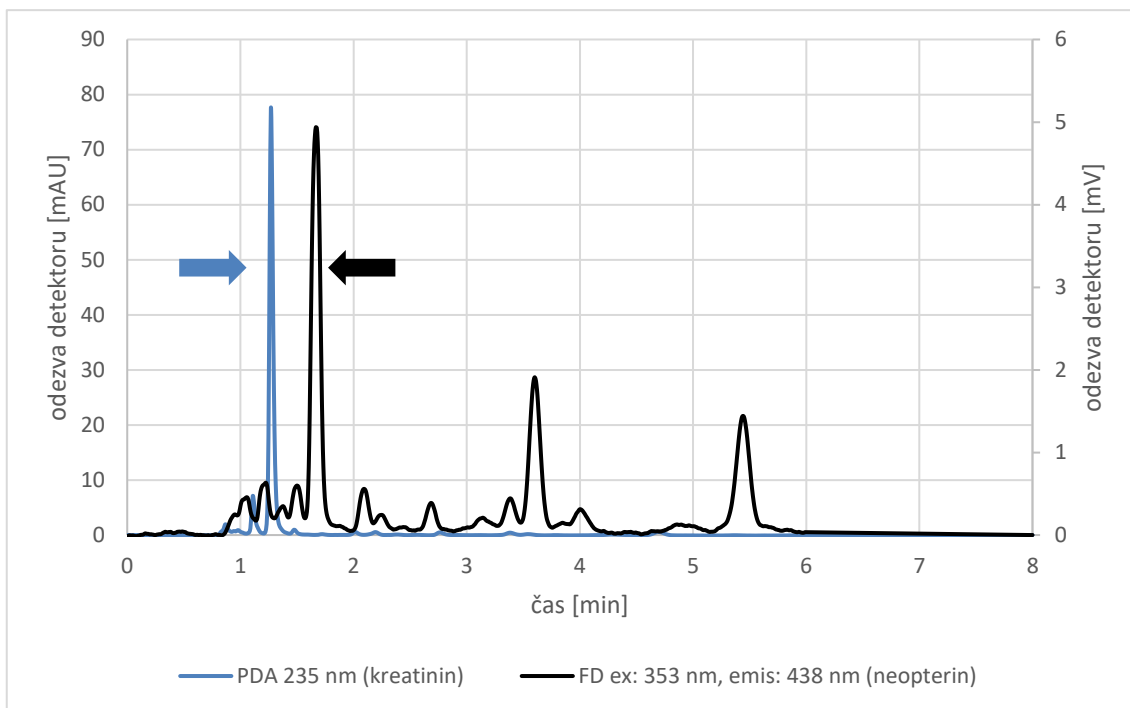
Obrázek 27: Chromatogram moči, spojené kolony Chromolith RP-18e, 50 x 4,6 mm a 100 x 3,0 mm, objem nástřiku 1 μ l, (mobilní fáze: fosfátový pufr o $c = 15$ mmol/l, pH = 6,5, průtok 0 – 3 min: 1 ml/min, 3 – 5 min: 3,5 ml/min), píky analytů označeny šipkami

5.1.5 Chromolith HighResolution RP-18e, 100 x 4,6 mm

Stacionární fáze této kolony je stejně jako v předchozím případě tvořena silikagelovým monolitem, který je modifikován navázáním C_{18} řetězců, volné silanolové skupiny jsou chráněny endcappingem. Na rozdíl od předchozích kolon monolit obsahuje menší makropóry (1,15 μm oproti 2 μm). Do této práce byla kolona zařazena na základě publikované metody pro stanovení neopterinu a kreatininu v plodové vodě a v exsudátu z ran [10]. Analýza byla opět prováděna se stejnou mobilní fází jako původní metoda, tedy s fosfátovým pufrům o koncentraci $c = 15 \text{ mmol/l}$ a pH 6,5. Uspokojivých výsledků bylo dosaženo pouze při separaci směsi standardů, chromatogram je na obrázku číslo 28. Při analýze moči nedošlo k úplnému oddělení píku neopterinu od přítomné nečistoty, což je zobrazeno na obrázku číslo 29. Průtok mobilní fáze byl do 2. minuty 2,5 ml/min a od 2. minuty 3 ml/min. Retenční čas kreatininu ve směsi standardů byl 1,28 min. a ve vzorku moči 1,29 min. Retenční čas neopterinu byl ve směsi standardů 1,70 min. a ve vzorku moči 1,71 min. Doba analýzy byla 8 minut.



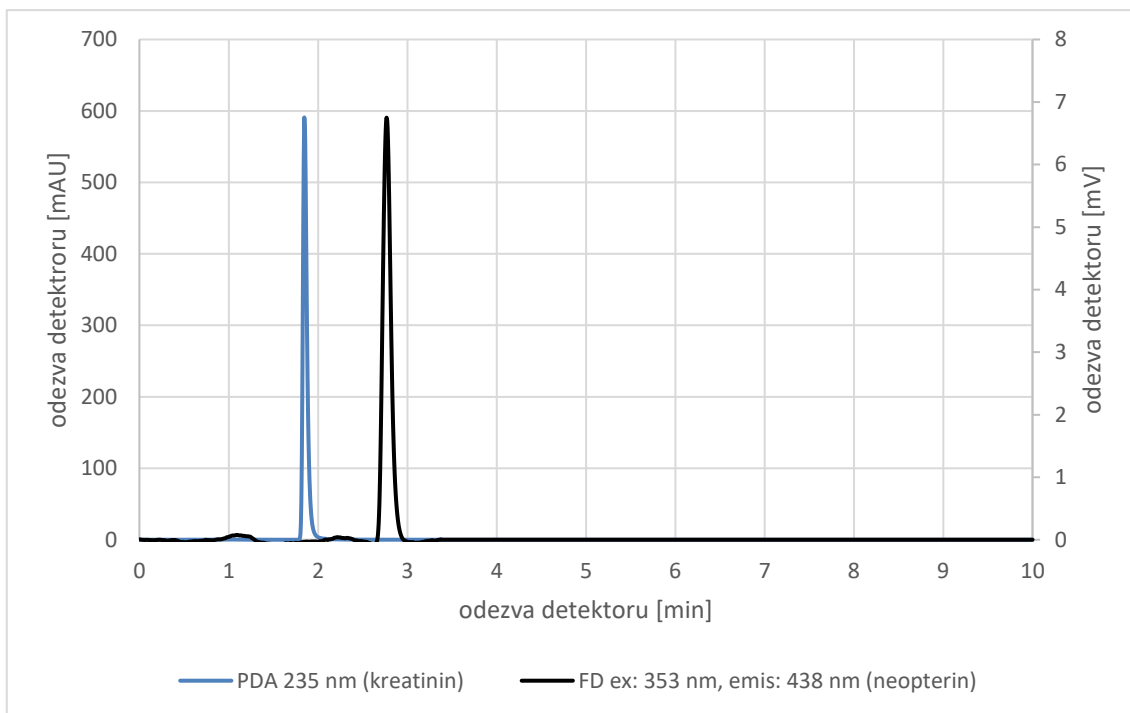
Obrázek 28: Chromatogram směsi standardů, kolona Chromolith HighResolution RP-18e, 100 x 4,6 mm, objem nástřiku 1 μl , (mobilní fáze: fosfátový pufr o $c = 15 \text{ mmol/l}$, pH = 6,5, průtok 0 – 2 min: 2,5 ml/min, 2 – 8 min: 3 ml/min)



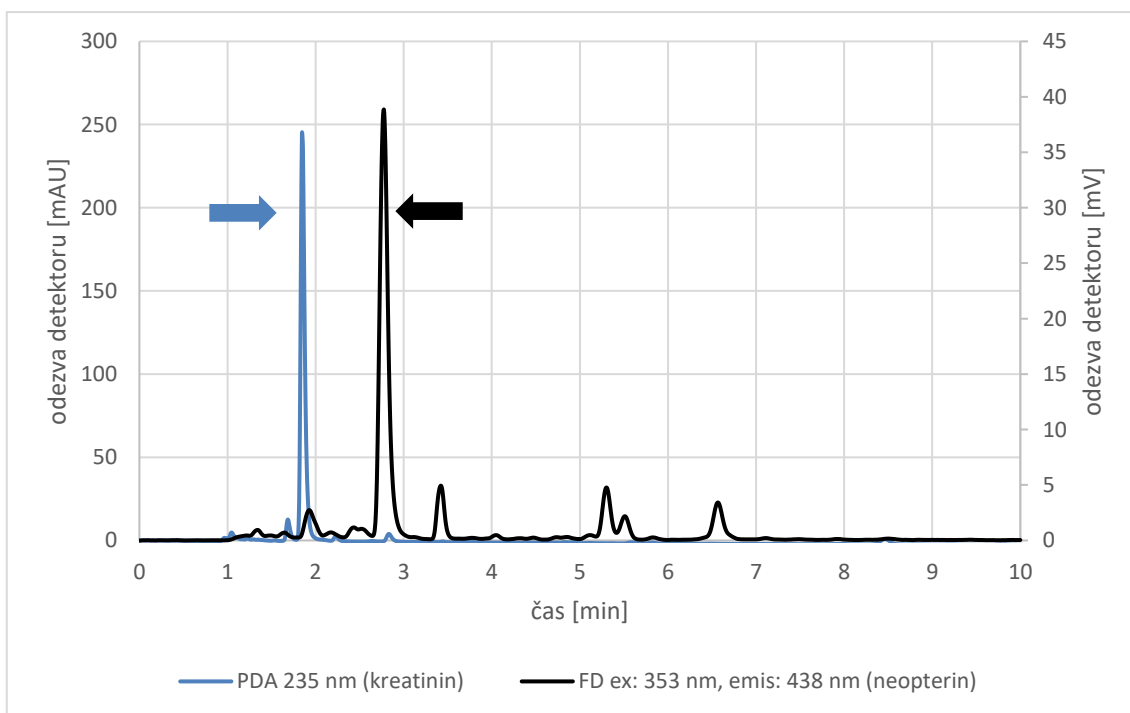
Obrázek 29: Chromatogram moči, kolona Chromolith HighResolution RP-18e, 100 x 4,6 mm, objem nástřiku 1 μ l, (mobilní fáze: fosfátový pufr o $c = 15$ mmol/l, pH = 6,5, průtok 0 – 2 min: 2,5 ml/min, 2 – 8 min: 3 ml/min), píky analytů označeny šipkami

5.1.6 Kinetex Polar C₁₈, 100 x 4,6 mm, 2,6 μ m

Stacionární fáze této kolony je tvořena silikagelovými povrchově porézními částicemi, které jsou modifikovány navázáním C₁₈ řetězců. Analýza byla opět prováděna se stejnou mobilní fází jako původní metoda, tedy s fosfátovým pufrům o koncentraci $c = 15$ mmol/l a pH 6,5. Uspokojivých výsledků bylo dosaženo jak při separaci směsi standardů, tak i při analýze moči, chromatogramy jsou zobrazeny na obrázcích číslo 30 a 31. Průtok mobilní fáze byl do 3. minuty 1 ml/min a od 3. minuty 1,5 ml/min. Retenční čas kreatininu ve směsi standardů byl 1,84 min. a ve vzorku moči také 1,84 min. Retenční čas neopterinu byl ve směsi standardů i ve vzorku moči 2,77 min. Doba analýzy byla 10 minut.



Obrázek 30: Chromatogram směsi standardů, kolona Kinetex Polar C₁₈, 100 x 4,6 mm, 2,6 μm, objem nástřiku 1 μl, (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5, průtok 0 – 3 min: 1 ml/min, 3 – 10 min: 1,5 ml/min)



Obrázek 31: Chromatogram moči, kolona Kinetex Polar C₁₈, 100 x 4,6 mm, 2,6 μm, objem nástřiku 1 μl, (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5, průtok 0 – 3 min: 1 ml/min, 3 – 10 min: 1,5 ml/min), píky analytů označeny šipkami

5.1.7 Shrnutí

Na základě chromatogramů zobrazených na obrázcích číslo 14 – 31 se jako optimální pro stanovení neopterinu a kreatininu v moči jeví kolony YMC Triart C-18, 150 x 4,6 mm, 3 µm a Kinetex Polar C₁₈, 100 x 4,6 mm, 2,6 µm. U těchto kolon byly píky stanovovaných látek dostatečně ostré. Tyto kolony také zajistily dostatečné oddělení analytů od balastních látek přítomných v biologickém materiálu.

5.2 Výsledky hodnocených parametrů

Následující parametry byly zjišťovány u všech testovaných kolon. V tabulkách je vždy barevně označeno, zda výsledek odpovídá doporučeným hodnotám.

5.2.1 Opakovatelnost nástřiku

Testování bylo provedeno jak na směsi standardů, kde byla analýza opakována třikrát, tak i na vzorku moči, kde byla analýza provedena šestkrát. Vyhodnocení výsledků bylo provedeno v programu Excel za využití vzorce uvedeného v kapitole 4.7.1, ve stejné kapitole se také nachází doporučení, dle kterého byly hodnoceny výsledky v biologickém materiálu. Výsledky opakovatelnosti nástřiku pro jednotlivé kolony jsou uvedeny v tabulkách číslo 9 – 15.

Tabulka 9: Výsledky opakovatelnosti nástřiku s kolonou Gemini C₁₈, 150 x 3,0 mm, 5 µm (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5)

| | směs standardů | | | | moč | | | |
|------------|-------------------------|--------|-------------------------|---------|-------------------------|--------|-------------------------|--------|
| | neopterin | | kreatinin | | neopterin | | kreatinin | |
| | t _R [min] | plocha | t _R [min] | plocha | t _R [min] | plocha | t _R [min] | plocha |
| 1 | 3,098 | 167194 | 1,884 | 3104071 | 3,106 | 24417 | 1,881 | 125423 |
| 2 | 3,101 | 165459 | 1,888 | 3117077 | 3,100 | 23489 | 1,881 | 121470 |
| 3 | 3,092 | 153302 | 1,887 | 3102441 | 3,135 | 23349 | 1,891 | 113624 |
| 4 | | | | | 3,130 | 23081 | 1,889 | 112107 |
| 5 | | | | | 3,126 | 23761 | 1,884 | 108070 |
| 6 | | | | | 3,126 | 24126 | 1,891 | 105843 |
| průměr | 3,097 | 161985 | 1,89 | 3110574 | 3,12 | 23703 | 1,89 | 114422 |
| RSD [%] | 0,15 | 4,67 | 0,11 | 0,26 | 0,45 | 2,11 | 0,25 | 6,66 |

Tabulka 10: Výsledky opakovatelnosti nástřiku s kolonou Kinetex HILIC, 150 x 3,0 mm, 2,6 µm (mobilní fáze: acetonitril, octan amonný o c = 10 mmol/l, pH = 4,0, 90:10)

| | směs standardů | | | | moč | | | |
|---------|-------------------------|--------|-------------------------|---------|-------------------------|--------|-------------------------|--------|
| | neopterin | | kreatinin | | neopterin | | kreatinin | |
| | t _R [min] | plocha | t _R [min] | plocha | t _R [min] | plocha | t _R [min] | plocha |
| 1 | 4,547 | 38624 | 5,068 | 4750843 | 4,755 | 101390 | 5,066 | 624160 |
| 2 | 4,919 | 35912 | 5,043 | 4774188 | 4,892 | 100985 | 5,079 | 618500 |
| 3 | 4,725 | 37821 | 5,058 | 4792407 | 4,953 | 93149 | 5,058 | 628391 |
| 4 | | | | | 4,931 | 92469 | 5,076 | 629403 |
| 5 | | | | | 4,931 | 90268 | 5,065 | 623321 |
| 6 | | | | | 4,914 | 92140 | 5,066 | 627902 |
| průměr | 4,730 | 37452 | 5,06 | 4762516 | 4,89 | 95067 | 5,07 | 625280 |
| RSD [%] | 3,93 | 3,72 | 0,25 | 0,44 | 1,42 | 5,09 | 0,15 | 0,66 |

Tabulka 11: Výsledky opakovatelnosti nástřiku s kolonou YMC Triart C-18, 150 x 4,6 mm, 3 µm (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5)

| | směs standardů | | | | moč | | | |
|---------|-------------------------|--------|-------------------------|---------|-------------------------|--------|-------------------------|--------|
| | neopterin | | kreatinin | | neopterin | | kreatinin | |
| | t _R [min] | plocha | t _R [min] | plocha | t _R [min] | plocha | t _R [min] | plocha |
| 1 | 6,099 | 45837 | 3,705 | 1963541 | 6,187 | 10324 | 3,736 | 58450 |
| 2 | 6,102 | 45524 | 3,710 | 1976522 | 6,182 | 10477 | 3,732 | 58672 |
| 3 | 6,111 | 45372 | 3,711 | 1997020 | 6,189 | 10419 | 3,732 | 58610 |
| 4 | | | | | 6,194 | 10399 | 3,735 | 58780 |
| 5 | | | | | 6,192 | 10425 | 3,739 | 58248 |
| 6 | | | | | 6,196 | 10350 | 3,749 | 58381 |
| průměr | 6,104 | 45578 | 3,71 | 1970032 | 6,19 | 10399 | 3,74 | 58524 |
| RSD [%] | 0,10 | 0,52 | 0,09 | 0,86 | 0,08 | 0,53 | 0,16 | 0,34 |

Tabulka 12: Výsledky opakovatelnosti nástřiku s kolonou YMC Triart C-18, 150 x 4,6 mm, 3 µm (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 5 mmol/l, pH = 6,5)

| | směs standardů | | | | moč | | | |
|---------|-------------------------|--------|-------------------------|---------|-------------------------|--------|-------------------------|--------|
| | neopterin | | kreatinin | | neopterin | | kreatinin | |
| | t _R [min] | plocha | t _R [min] | plocha | t _R [min] | plocha | t _R [min] | plocha |
| 1 | 6,142 | 49055 | 3,792 | 2046251 | 6,177 | 8020 | 3,762 | 54298 |
| 2 | 6,132 | 49576 | 3,788 | 2029928 | 6,165 | 8271 | 3,761 | 54266 |
| 3 | 6,140 | 49539 | 3,784 | 2040808 | 6,164 | 8307 | 3,758 | 54926 |
| 4 | | | | | 6,164 | 8200 | 3,757 | 54477 |
| 5 | | | | | 6,161 | 8044 | 3,753 | 54323 |
| 6 | | | | | 6,160 | 8074 | 3,755 | 54425 |
| průměr | 6,14 | 49390 | 3,79 | 2038090 | 6,17 | 8153 | 3,76 | 54453 |
| RSD [%] | 0,09 | 0,59 | 0,11 | 0,41 | 0,10 | 1,51 | 0,09 | 0,45 |

Tabulka 13: Výsledky opakovatelnosti nástřiku se spojenými kolonami Chromolith RP-18e, 50 x 4,6 mm a 100 x 3,0 mm (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5)

| | směs standardů | | | | moč | | | |
|---------|-------------------------|--------|-------------------------|---------|-------------------------|--------|-------------------------|--------|
| | neopterin | | kreatinin | | neopterin | | kreatinin | |
| | t _R [min] | plocha | t _R [min] | plocha | t _R [min] | plocha | t _R [min] | plocha |
| 1 | 2,575 | 47657 | 1,979 | 1999260 | 2,542 | 10312 | 1,959 | 70589 |
| 2 | 2,573 | 47532 | 1,974 | 1995132 | 2,545 | 9820 | 1,963 | 70569 |
| 3 | 2,576 | 47621 | 1,986 | 1968747 | 2,543 | 10044 | 1,961 | 71471 |
| 4 | | | | | 2,549 | 10487 | 1,966 | 70083 |
| 5 | | | | | 2,543 | 9751 | 1,960 | 69288 |
| 6 | | | | | 2,544 | 10503 | 1,961 | 69660 |
| průměr | 2,575 | 47603 | 1,98 | 1997196 | 2,54 | 10153 | 1,96 | 70277 |
| RSD [%] | 0,06 | 0,14 | 0,30 | 0,83 | 0,10 | 3,25 | 0,13 | 1,10 |

Tabulka 14: Výsledky opakovatelnosti nástřiku s kolonou Chromolith HighResolution RP-18e, 100 x 4,6 mm (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5)

| | směs standardů | | | | moč | | | |
|------------|-------------------------|--------|-------------------------|---------|-------------------------|--------|-------------------------|--------|
| | neopterin | | kreatinin | | neopterin | | kreatinin | |
| | t _R [min] | plocha | t _R [min] | plocha | t _R [min] | plocha | t _R [min] | plocha |
| 1 | 1,691 | 17562 | 1,286 | 2987044 | 1,713 | 3532 | 1,287 | 23078 |
| 2 | 1,715 | 18959 | 1,272 | 2988627 | 1,710 | 3426 | 1,288 | 22754 |
| 3 | 1,705 | 16479 | 1,274 | 2904867 | 1,708 | 3539 | 1,291 | 22683 |
| 4 | | | | | 1,710 | 3436 | 1,287 | 22847 |
| 5 | | | | | 1,708 | 3480 | 1,288 | 22766 |
| 6 | | | | | 1,708 | 3449 | 1,282 | 22878 |
| průměr | 1,704 | 17667 | 1,28 | 2987836 | 1,71 | 3477 | 1,29 | 22834 |
| RSD [%] | 0,71 | 7,04 | 0,59 | 1,60 | 0,12 | 1,41 | 0,23 | 0,61 |

Tabulka 15: Výsledky opakovatelnosti nástřiku s kolonou Kinetex Polar C₁₈, 100 x 4,6 mm, 2,6 μm (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5)

| | směs standardů | | | | moč | | | |
|------------|-------------------------|--------|-------------------------|---------|-------------------------|--------|-------------------------|--------|
| | neopterin | | kreatinin | | neopterin | | kreatinin | |
| | t _R [min] | plocha | t _R [min] | plocha | t _R [min] | plocha | t _R [min] | plocha |
| 1 | 2,765 | 44264 | 1,844 | 1954713 | 2,769 | 255287 | 1,834 | 811441 |
| 2 | 2,771 | 44562 | 1,838 | 1971232 | 2,767 | 248011 | 1,834 | 805180 |
| 3 | 2,769 | 44336 | 1,840 | 1969716 | 2,767 | 241932 | 1,836 | 798703 |
| 4 | | | | | 2,768 | 235576 | 1,839 | 801420 |
| 5 | | | | | 2,767 | 232144 | 1,841 | 799435 |
| 6 | | | | | 2,767 | 230792 | 1,838 | 797082 |
| průměr | 2,768 | 44387 | 1,84 | 1962973 | 2,77 | 240624 | 1,84 | 802210 |
| RSD [%] | 0,11 | 0,35 | 0,17 | 0,47 | 0,03 | 4,01 | 0,15 | 0,66 |

5.2.2 Rozlišení

Testování bylo provedeno na vzorku moči a bylo šestkrát opakováno, výsledná hodnota byla zprůměrována. Výsledky byly získány z ovládacího systému LC Solution a hodnoceny dle doporučení, které je uvedené v kapitole 4.7.2. Výsledky rozlišení píků pro jednotlivé kolony jsou uvedeny v tabulkách číslo 16 – 22.

Tabulka 16: Výsledky rozlišení kolony Gemini C₁₈, 150 x 3,0 mm, 5 μm (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5)

| moč | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | průměr |
|-----------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| | neopterin | 2,836 | 2,592 | 2,642 | 2,819 | 2,958 | 2,975 | 2,80 |
| kreatinin | 1,081 | 1,025 | 0,935 | 0,949 | 0,995 | 0,911 | 0,98 | |

Tabulka 17: Výsledky rozlišení kolony Kinetex HILIC, 150 x 3,0 mm, 2,6 μm (mobilní fáze: acetonitril, octan amonný o c = 10 mmol/l, pH = 4,0, 90:10)

| moč | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | průměr |
|-----------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| | neopterin | 0,806 | 0,883 | 0,859 | 0,900 | 0,803 | 0,809 | 0,84 |
| kreatinin | 1,888 | 1,861 | 1,794 | 1,789 | 1,853 | 1,787 | 1,83 | |

Tabulka 18: Výsledky rozlišení kolony YMC Triart C-18, 150 x 4,6 mm, 3 μm (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5)

| moč | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | průměr |
|-----------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| | neopterin | 1,472 | 1,428 | 1,464 | 1,449 | 1,468 | 1,440 | 1,45 |
| kreatinin | 2,025 | 2,056 | 2,067 | 2,075 | 2,084 | 2,135 | 2,07 | |

Tabulka 19: Výsledky rozlišení kolony YMC Triart C-18, 150 x 4,6 mm, 3 μm (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 5 mmol/l, pH = 6,5)

| moč | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | průměr |
|-----------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| | neopterin | 1,486 | 1,503 | 1,479 | 1,517 | 1,476 | 1,447 | 1,48 |
| kreatinin | 2,805 | 2,795 | 2,831 | 2,804 | 2,796 | 2,790 | 2,80 | |

Tabulka 20: Výsledky rozlišení spojených kolon Chromolith RP-18e, 50 x 4,6 mm a 100 x 3,0 mm (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5)

| moč | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | průměr |
|-----------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| | neopterin | 1,032 | 1,131 | 0,611 | 0,847 | 0,839 | 0,671 | 0,86 |
| kreatinin | 1,110 | 1,096 | 1,131 | 1,121 | 1,138 | 1,138 | 1,12 | |

Tabulka 21: Výsledky rozlišení kolony Chromolith HighResolution RP-18e, 100 x 4,6 mm (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5)

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | průměr |
|-----|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| moč | neopterin | 1,243 | 1,206 | 1,178 | 1,255 | 1,184 | 1,250 | 1,22 |
| | kreatinin | 2,108 | 2,104 | 2,147 | 2,109 | 2,134 | 2,048 | 2,11 |

Tabulka 22: Výsledky rozlišení kolony Kinetex Polar C₁₈, 100 x 4,6 mm, 2,6 μm (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5)

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | průměr |
|-----|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| moč | neopterin | 1,564 | 1,567 | 1,62 | 1,602 | 1,507 | 1,642 | 1,58 |
| | kreatinin | 1,703 | 1,722 | 1,666 | 1,676 | 1,675 | 1,666 | 1,68 |

5.2.3 Symetrie píků

Testování bylo provedeno na vzorku moči a bylo šestkrát opakováno, výsledná hodnota byla zprůměrována. Výsledky byly získány z ovládacího systému LC Solution a hodnoceny dle doporučení Českého lékopisu, které je uvedené v kapitole 4.7.3. Výsledky symetrie píků pro jednotlivé kolony jsou uvedeny v tabulkách číslo 23 – 29.

Tabulka 23: Výsledky faktoru symetrie kolony Gemini C₁₈, 150 x 3,0 mm, 5 μm (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5)

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | průměr |
|-----|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| moč | neopterin | 1,323 | 1,323 | 1,178 | 1,153 | 1,084 | 1,320 | 1,2 |
| | kreatinin | 1,436 | 1,424 | 1,396 | 1,388 | 1,331 | 1,360 | 1,4 |

Tabulka 24: Výsledky faktoru symetrie kolony Kinetex HILIC, 150 x 3,0 mm, 2,6 μm (mobilní fáze: acetonitril, octan amonný o c = 10 mmol/l, pH = 4,0, 90:10)

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | průměr |
|-----|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| moč | neopterin | 1,379 | 1,158 | 0,944 | 1,079 | 1,000 | 1,114 | 1,1 |
| | kreatinin | 1,481 | 1,492 | 1,493 | 1,521 | 1,485 | 1,531 | 1,5 |

Tabulka 25: Výsledky faktoru symetrie kolony YMC Triart C-18, 150 x 4,6 mm, 3 µm (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5)

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | průměr |
|-----|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| moč | neopterin | 1,131 | 1,112 | 1,141 | 1,189 | 1,161 | 1,185 | 1,2 |
| | kreatinin | 1,242 | 1,250 | 1,256 | 1,282 | 1,315 | 1,317 | 1,3 |

Tabulka 26: Výsledky faktoru symetrie kolony YMC Triart C-18, 150 x 4,6 mm, 3 µm (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 5 mmol/l, pH = 6,5)

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | průměr |
|-----|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| moč | neopterin | 1,100 | 1,166 | 1,133 | 1,219 | 1,195 | 1,258 | 1,2 |
| | kreatinin | 1,352 | 1,354 | 1,353 | 1,351 | 1,357 | 1,353 | 1,4 |

Tabulka 27: Výsledky faktoru symetrie spojených kolon Chromolith RP-18e, 50 x 4,6 mm a 100 x 3,0 mm (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5)

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | průměr |
|-----|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| moč | neopterin | 1,337 | 1,267 | 1,393 | 1,398 | 1,386 | 1,407 | 1,3 |
| | kreatinin | 1,781 | 1,788 | 1,792 | 1,802 | 1,780 | 1,785 | 1,8 |

Tabulka 28: Výsledky faktoru symetrie kolony Chromolith HighResolution RP-18e, 100 x 4,6 mm (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5)

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | průměr |
|-----|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| moč | neopterin | 1,100 | 1,078 | 1,075 | 1,090 | 1,112 | 1,091 | 1,1 |
| | kreatinin | 1,428 | 1,424 | 1,432 | 1,467 | 1,467 | 1,488 | 1,5 |

Tabulka 29: Výsledky faktoru symetrie kolony Kinetex Polar C₁₈, 100 x 4,6 mm, 2,6 µm (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5)

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | průměr |
|-----|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| moč | neopterin | 1,325 | 1,316 | 1,315 | 1,317 | 1,325 | 1,324 | 1,3 |
| | kreatinin | 1,641 | 1,604 | 1,592 | 1,642 | 1,621 | 1,607 | 1,6 |

5.2.4 Účinnost kolony

Testování N bylo provedeno na směsi standardů a bylo třikrát opakováno, výsledná hodnota byla zprůměrována. Výsledky byly získány z ovládacího systému LC Solution a hodnoceny dle doporučení FDA, které je uvedené v kapitole 4.7.4, ve stejné kapitole je také uvedený vzorec, podle kterého bylo vypočteno HETP. Výsledky účinnosti kolon jsou uvedeny v tabulkách číslo 30 – 36.

Tabulka 30: Výsledky účinnosti kolony Gemini C₁₈, 150 x 3,0 mm, 5 μm (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5)

| směs standardů | | 1 | 2 | 3 | průměr N | HETP [μm] |
|----------------|-----------|------|------|------|----------|-----------|
| | neopterin | 1598 | 1783 | 2664 | 2015 | 45 |
| kreatinin | 3448 | 3263 | 3289 | 3333 | 74 | |

Tabulka 31: Výsledky účinnosti kolony Kinetex HILIC, 150 x 3,0 mm, 2,6 μm (mobilní fáze: acetonitril, octan amonný o c = 10 mmol/l, pH = 4,0, 90:10)

| směs standardů | | 1 | 2 | 3 | průměr N | HETP [μm] |
|----------------|-----------|------|------|------|----------|-----------|
| | neopterin | 1339 | 1722 | 1489 | 1517 | 99 |
| kreatinin | 7946 | 7378 | 7581 | 7635 | 20 | |

Tabulka 32: Výsledky účinnosti kolony YMC Triart C-18, 150 x 4,6 mm, 3 μm (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5)

| směs standardů | | 1 | 2 | 3 | průměr N | HETP [μm] |
|----------------|-----------|-------|-------|-------|----------|-----------|
| | neopterin | 9323 | 9398 | 8898 | 9206 | 16 |
| kreatinin | 10253 | 10135 | 10181 | 10190 | 15 | |

Tabulka 33: Výsledky účinnosti kolony YMC Triart C-18, 150 x 4,6 mm, 3 μm (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 5 mmol/l, pH = 6,5)

| směs standardů | | 1 | 2 | 3 | průměr N | HETP [μm] |
|----------------|-----------|------|------|------|----------|-----------|
| | neopterin | 9799 | 9669 | 9827 | 9765 | 15 |
| kreatinin | 9705 | 9838 | 9793 | 9779 | 15 | |

Tabulka 34: Výsledky účinnosti spojených kolon Chromolith RP-18e, 50 x 4,6 mm a 100 x 3,0 mm (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5)

| směs standardů | | 1 | 2 | 3 | průměr N | HETP [μm] |
|----------------|-----------|------|------|------|----------|------------------------|
| | neopterin | | 1856 | 1872 | 1850 | 1859 |
| kreatinin | | 2077 | 2170 | 2195 | 2147 | 70 |

Tabulka 35: Výsledky účinnosti kolony Chromolith HighResolution RP-18e, 100 x 4,6 mm (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5)

| směs standardů | | 1 | 2 | 3 | průměr N | HETP [μm] |
|----------------|-----------|------|------|------|----------|------------------------|
| | neopterin | | 2062 | 1966 | 2033 | 2020 |
| kreatinin | | 4820 | 4323 | 4372 | 4505 | 49 |

Tabulka 36: Výsledky účinnosti kolony Kinetex Polar C₁₈, 100 x 4,6 mm, 2,6 μm (mobilní fáze: fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5)

| směs standardů | | 1 | 2 | 3 | průměr N | HETP [μm] |
|----------------|-----------|------|------|------|----------|------------------------|
| | neopterin | | 3751 | 3754 | 3756 | 3754 |
| kreatinin | | 5538 | 5368 | 5461 | 5455 | 27 |

5.2.5 Shrnutí

V tabulce číslo 37 je přehledně shrnuto, jak jednotlivé kolony ve zjišťovaných parametrech vyhověly doporučením. Dle výsledků lze říct, že pro stanovení neopterinu a kreatininu v moči není příliš vhodná metoda HILIC. Při jejím využití bylo dosaženo nedostatečných hodnot opakovatelnosti stanovení neopterinu jak ve směsi standardů, tak i ve vzorku moči. Také separační účinnost kolony a rozlišení píku bylo pro neopterin nízké.

Z kolon YMC Triart C-18, 150 x 4,6 mm, 3 μm a Kinetex Polar C₁₈, 100 x 4,6 mm, 2,6 μm , které se na základě vzhledu chromatogramů a tvaru píků jeví pro stanovení neopterinu a kreatininu v moči jako nevhodnější byla vybrána kolona YMC Triart C-18, 150 x 4,6 mm, 3 μm . Tato kolona vyhověla v nejvíce testovaných parametrech. Jediným z hodnocených parametrů, kde kolona nevyhověla doporučením je rozlišení píku neopterinu ve vzorku moči. Kolona Kinetex Polar C₁₈, 100 x 4,6 mm, 2,6 μm nevyhověla doporučením v opakovatelnosti plochy píku neopterinu v moči a ve faktoru symetrie píku kreatininu v moči.

Tabulka 37: Shrnutí hodnocených parametrů testovaných kolon

| kolona | mobilní fáze | látka | opakovatelnost nástřiku RSD [%] | | | | rozlišení R _s | faktor symetrie A _s | účinnost N |
|---|--|-----------|------------------------------------|--------|----------------|--------|-----------------------------|-----------------------------------|-------------------|
| | | | směs standardů | | moč | | moč | moč | směs standardů |
| | | | t _R | plocha | t _R | plocha | | | |
| Gemini C ₁₈ , 150 x 3,0 mm, 5 μm | fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5 | neopterin | 0,15 | 4,67 | 0,45 | 2,11 | 2,80 | 1,2 | 2015 |
| | | kreatinin | 0,11 | 0,26 | 0,25 | 6,66 | 0,98 | 1,4 | 3333 |
| Kinetex HILIC, 150 x 3,0 mm, 2,6 μm | acetonitril, octan amonný o c = 10 mmol/l, pH = 4,0, 90:10 | neopterin | 3,93 | 3,72 | 1,42 | 5,09 | 0,84 | 1,1 | 1517 |
| | | kreatinin | 0,25 | 0,44 | 0,15 | 0,66 | 1,83 | 1,5 | 7635 |
| YMC Triart C-18, 150 x 4,6 mm, 3 μm | fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5 | neopterin | 0,10 | 0,52 | 0,08 | 0,53 | 1,45 | 1,2 | 9206 |
| | | kreatinin | 0,09 | 0,86 | 0,16 | 0,34 | 2,07 | 1,3 | 10190 |
| | fosfátový pufr o c = 5 mmol/l, pH = 6,5 | neopterin | 0,09 | 0,59 | 0,10 | 1,51 | 1,48 | 1,2 | 9765 |
| | | kreatinin | 0,11 | 0,41 | 0,09 | 0,45 | 2,80 | 1,4 | 9778 |
| Chromolith RP-18e, 50 x 4,6 mm a 100 x 3,0 mm | fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5 | neopterin | 0,06 | 0,14 | 0,10 | 3,25 | 0,86 | 1,3 | 1859 |
| | | kreatinin | 0,30 | 0,83 | 0,13 | 1,10 | 1,12 | 1,8 | 2147 |
| Chromolith HighResolution RP-18e, 100 x 4,6 mm | fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5 | neopterin | 0,71 | 7,04 | 0,12 | 1,41 | 1,22 | 1,1 | 2020 |
| | | kreatinin | 0,59 | 1,60 | 0,23 | 0,61 | 2,11 | 1,5 | 4505 |
| Kinetex Polar C ₁₈ , 100 x 4,6 mm, 2,6 μm | fosfátový pufr o c = 15 mmol/l, pH = 6,5 | neopterin | 0,11 | 0,35 | 0,03 | 4,01 | 1,58 | 1,3 | 3754 |
| | | kreatinin | 0,17 | 0,47 | 0,15 | 0,66 | 1,68 | 1,6 | 5455 |

6. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo doporučit chromatografickou kolonu, která bude schopna spolehlivě zajistit stanovení neopterinu a kreatininu v moči pro klinickou praxi. V práci byly zhodnoceny a porovnány vlastnosti šesti kolon. Hodnocení bylo prováděno na základě následujících parametrů: opakovatelnost nástřiku, rozlišení, symetrie píků a účinnost kolony. Tyto parametry byly hodnoceny dle doporučení FDA nebo Českého lékopisu. Žádná z testovaných kolon nevyhověla ve všech parametrech doporučením.

Jako nejvhodnější byla vybrána kolona YMC Triart C-18, 150 x 4,6 mm, 3 μm s mobilní fází tvořenou fosfátovým pufrům o koncentraci $c = 15 \text{ mmol/l}$ a pH 6,5. Tato kolona zajistila spolehlivou analýzu neopterinu a kreatininu jak ve směsi standardů, tak i ve vzorku moči. Jediným z hodnocených parametrů, kde kolona nevyhověla doporučením je rozlišení píku neopterinu ve vzorku moči. Zjištěná hodnota ale nevyhověla doporučení pouze o pět setin. Následnou další optimalizací analýzy by bylo možné tyto nevýhody odstranit. Optimalizace a validace metody již nebyla součástí zadání této práce.

U vybrané kolony bylo také zjišťováno, zda po provedení analýzy většího množství vzorku nedochází ke ztrátě separační účinnosti. Separace směsi standardů po provedení analýzy 30 a 60 vzorků prokázala, že separační účinnost s rostoucím počtem analýz neklesá.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] H. WACHTER, D. FUCHS, A. HAUSEN, et al. *Neopterin: Biochemistry - Methods - Clinical Application*. Berlin: de Gruyter, 1992. ISBN 978-3-11-011790-5
- [2] 2-Amino-6-(1,2,3-trihydroxypropyl)-4(3H)-pteridinone. *PubChem.com* [online]. [cit. 17. 3. 2020]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/neopterin>
- [3] Ł. MICHALAK, M. BULSKA, K. STRZĄBAŁA, et al. Neopterin as a marker of cellular immunological response. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 71 (2017), 727-736. doi: 10.5604/01.3001.0010.3851
- [4] S. CHUANG, H. BOEING, S. E. VOLLSET, et al. Cellular immune activity biomarker neopterin is associated hyperlipidemia: results from a large population-based study. *Immun. Ageing*, 13 (2016). doi: 10.1186/s12979-016-0059-y
- [5] Neopterin ELISA. *Ibl-international.com* [online]. [cit. 31. 3. 2020]. Dostupné z: <https://www.ibl-international.com/en/neopterin>
- [6] D. SOLICHOVÁ, B. MELICHAR, M. KLEJNA, et al. Stanovení neopterinu v moči u geriatrických pacientů. *Čes. Ger. Rev.*, 1 (2003), 32-38.
- [7] A. HAMMERER-LERCHER, C. MOSER, V. LEICHTFRIED, et al. Comparison of a commercial urinary neopterin radioimmunoassay with high performance liquid chromatography. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 50 (2012), 1075-1078. doi: 10.1515/cclm-2011-0861
- [8] X. XIONG, Y. ZHANG, W. ZHANG. Simultaneous determination of twelve polar pteridines including dihydro – and tetrahydropteridine in human urine by hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.*, 32 (2018), e4244. doi: 10.1002/bmc.4244
- [9] C. BURTON, H. SHI, Y. MA. Development of a high-performance liquid chromatography – Tandem mass spectrometry urinary pterinomics workflow. *Anal. Chim. Acta.*, 927 (2016), 72-81. doi: 10.1016/j.aca.2016.05.005

- [10] L. KUJOVSKÁ KRČMOVÁ, B. ČERVINKOVÁ, D. SOLICHOVÁ, et al. Fast and sensitive HPLC method for the determination of neopterin, kynurenine and tryptophan in amniotic fluid, malignant effusions and wound exudates. *Bioanalysis*, 7 (2015), 2751-2762. doi: 10.4155/bio.15.175
- [11] E. MARTÍN TORNERO, I. DURÁN MERÁS, A. ESPINOSA-MANSILLA. HPLC determination of serum pteridine pattern as biomarkers. *Talanta*, 128 (2014), 319-326. doi: 10.1016/j.talanta.2014.04.052
- [12] H. TOMŠÍKOVÁ, P. SOLICH, L. NOVÁKOVÁ. Sample preparation and UHPLC-FD analysis of pteridines in human urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 95 (2014), 265-272. doi: 10.1016/j.jpba.2014.03.012
- [13] P. GUIBAL, N. LÉVÊQUE, D. DOUMMAR, et al. Simultaneous Determination of All Forms of Biopterin and Neopterin in Cerebrospinal Fluid. *ACS Chem. Neurosci.*, 5 (2014), 533-541. doi: 10.1021/cn4001928
- [14] P. KOŚLIŃSKI, P. JARZEMSKI, M. J. MARKUSZEWSKI, et al. Determination of pterins in urine by HPLC with UV and fluorescent detection using different types of chromatographic stationary phases (HILIC, RP C₈, RP C₁₈). *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 91 (2014), 37-45. doi: 10.1016/j.jpba.2013.12.012
- [15] C. BURTON, H. SHI, Y. MA. Simultaneous Detection of Six Urinary Pteridines and Creatinine by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for Clinical Breast Cancer Detection. *Anal. Chem.*, 85 (2013), 11137-11145. doi: 10.1021/ac403124a
- [16] A. JIMÉNEZ GIRÓN, E. MARTÍN-TORNERO, M. C. HURTADO-SÁNCHEZ, et al. A simple HPLC-ESI-MS method for the direct determination of ten pteridinic biomarkers in human urine. *Talanta*, 101 (2012), 465-472. doi: 10.1016/j.talanta.2012.09.061
- [17] A. M. DE LLANOS, A. ESPINOSA-MANSILLA, F. CAÑADA-CAÑADA, et al. Separation and determination of 11 marker pteridines in human urine by liquid chromatography and fluorimetric detection. *J. Sep. Sci.*, 34 (2011), 1283-1292. doi: 10.1002/jssc.201000900
- [18] G. ALLEGRI, H. J. B. COSTA NETTO, L. N. L. FERREIRA GOMES, et al. Determination of six pterins in urine by LC-MS/MS. *Bioanalysis*, 4 (2012), 1739-1746. doi: 10.4155/bio.12.131

- [19] L. KRČMOVÁ, D. SOLICHOVÁ, B. MELICHAR, et al. Determination of neopterin, kynurenine, tryptophan and creatinine in human serum by high throughput HPLC. *Talanta*, 85 (2011), 1466-1471. doi: 10.1016/j.talanta.2011.06.027
- [20] M. J. CULZONI, A. MANCHA DE LLANOS, M. M. DE ZAN, et al. Enhanced MCR-ALS modeling of HPLC with fast scan fluorimetric detection second-order data for quantitation of metabolic disorder marker pteridines in urine. *Talanta*, 85 (2011), 2368-2374. doi: 10.1016/j.talanta.2011.07.086
- [21] Neopterin ELISA. *Alpco.com* [online]. [cit. 31. 3. 2020]. Dostupné z: <https://www.alpco.com/store/neopterin-elisa.html>
- [22] Neopterin RIA. *Alpco.com* [online]. [cit. 31. 3. 2020]. Dostupné z: <https://www.alpco.com/store/neopterin-ria.html>
- [23] Neopterin ELISA kit (Human). *Avivasysbio.com* [online]. [cit. 31. 3. 2020]. Dostupné z: <https://www.avivasysbio.com/neopterin-elisa-kit-human-okwb10530.html>
- [24] Neopterin ELISA. *Demeditec.com* [online]. [cit. 31. 3. 2020]. Dostupné z: <https://www.demeditec.com/en/products/neopterin-elisa-de59321>
- [25] Human Neopterin ELISA Kit. *Bt-laboratory.com* [online]. [cit. 31. 3. 2020]. Dostupné z: <http://www.bt-laboratory.com/product/human-neopterin-elisa-kit/>
- [26] Creatinine. *PubChem.com* [online]. [cit. 23. 3. 2020]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Creatinine>
- [27] K. KASHANI, M. H. ROSNER, M. OSTERMANN. Creatinine: From physiology to clinical application. *Eur. J. Intern. Med.*, 72 (2020), 9-14. doi: 10.1016/j.ejim.2019.10.025
- [28] Metoda – Kreatinin. *ukbd.fnhk.cz* [online]. [cit. 24. 3. 2020]. Dostupné z: <http://ukbd.fnhk.cz/metoda-kreatinin.html>
- [29] M. BERÁNEK, M. TICHÝ, J. CERMÁN, et al. *Vybrané kapitoly z klinické biochemie: pro studijní program Zdravotnická bioanalýtika*. Praha: Karolinum, 2013. ISBN 978-80-246-2186-9

- [30] R. A. MCPHERSON, M. R. PINCUS. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 23rd Edition. St. Louis: Elsevier, 2017. ISBN 978-0-323-29568-0
- [31] B. FRIEDECKÝ, T. ZIMA, P. SEDLÁK. Stanovisko ČSKB k současnému stavu standardizace stanovení kreatininu v séru/plazmě. *Kl. Biochem. Metab.*, 20 (2012), 45-46.
- [32] J. F. MOORE, J. D. SHARER. Methods for Quantitative Creatinine Determination. *Curr. Protoc. Hum. Genet.*, 93 (2017), A.30.1-A.30.7. doi: 10.1002/cphg.38
- [33] Creatinine Urinary Detection Kit. *Thermofisher.com* [online]. [cit. 2. 4. 2020]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EIACUN?SID=srch-srp-EIACUN#/EIACUN?SID=srch-srp-EIACUN>
- [34] Creatinine Parameter Assay Kit. *Rndsystems.com* [online]. [cit. 2. 4. 2020]. Dostupné z: https://www.rndsystems.com/products/creatinine-parameter-assay-kit_kge005
- [35] Creatinine Assay Kit. *Abcam.com* [online]. [cit. 2. 4. 2020]. Dostupné z: <https://www.abcam.com/creatinine-assay-kit-colorimetric-ab204537.html>
- [36] Creatinine Assay Kit. *Bioassaysys.com* [online]. [cit. 2. 4. 2020]. Dostupné z: <https://www.bioassaysys.com/Creatinine-Assay-Kit.html>
- [37] Creatinine Serum Detection Kit. *Arborassays.com* [online]. [cit. 2. 4. 2020]. Dostupné z: <https://www.arborassays.com/product/kb02-h-serum-creatinine-detection-kit/>
- [38] Creatinine (enzymatic). *Biovendor.cz* [online]. [cit. 2. 4. 2020]. Dostupné z: <https://www.biovendor.cz/creatinine-enzymatic-/p91.981896/>
- [39] Creatinine Assay Kit. *Sigmaaldrich.com* [online]. [cit. 2. 4. 2020]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/mak080?lang=en&ion=CZ>
- [40] Creatinine Assay Kit (Enzymatic). *Crystalchem.com* [online]. [cit. 2020-04-03]. Dostupné z: <http://www.crystalchem.com/creatinine-assay-kit.html>
- [41] Creatinine Assay Kit. *Abcam.com* [online]. [cit. 2. 4. 2020]. Dostupné z: <https://www.abcam.com/creatinine-assay-kit-ab65340.html>

- [42] Creatinine (Cr) Colorimetric Assay Kit (Sarcosine Oxidase Method). *Elabscience.com* [online]. [cit. 2. 4. 2020]. Dostupné z: [https://www.elabscience.com/p-creatinine_\(cr\)_colorimetric_assay_kit_\(sarcosine_oxidase_method\)-40470.html](https://www.elabscience.com/p-creatinine_(cr)_colorimetric_assay_kit_(sarcosine_oxidase_method)-40470.html)
- [43] Creatinine Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric). *Lsbio.com* [online]. [cit. 2. 4. 2020] Dostupné z: <https://www.lsbio.com/assaykits/creatinine-assay-kit-colorimetric-fluorometric-ls-k129/129?trid=247>
- [44] M. SUKHANG, A. JUNKUY, N. BUCKLEY, et al. An LC-MS/MS method for creatine and creatinine analysis in paraquat-intoxicated patients. *J. Environ. Sci. Health. B*, 55 (2020), 273-282. doi: 10.1080/03601234.2019.1690342
- [45] K. KUČEROVÁ, L. KUJOVSKÁ KRČMOVÁ, Z. MIKANOVA, et al. Determination of urinary retinol and creatinine as an early sensitive marker of renal dysfunction. *J. Chromatogr. A*, 1607 (2019). doi: 10.1016/j.chroma.2019.460390
- [46] N. SUN, Q. LI, L. ZHAO, et al. Simultaneous quantitative analysis of phosphocreatine, creatine and creatinine in plasma of children by HPLC–MS/MS method: Application to a pharmacokinetic study in children with viral myocarditis. *Biomed. Chromatogr.*, 33 (2019), e4558. doi: 10.1002/bmc.4558
- [47] Y. YUAN, M. JIANG, H. ZHANG, et al. Simultaneous quantification of urinary purines and creatinine by ultra high performance liquid chromatography with ultraviolet spectroscopy and quadrupole time-of-flight mass spectrometry: Method development, validation, and application to gout study. *J. Sep. Sci.*, 42 (2019), 2523-2533. doi: 10.1002/jssc.201900170
- [48] X. LIU, Y. LUO, C. ZHOU, et al. A sensitive and accurate method to simultaneously measure uric acid and creatinine in human saliva by using LC–MS/MS. *Bioanalysis*, 9 (2017), 1751-1760. doi: 10.4155/bio-2017-0189
- [49] Y. ZHAO, G. LIU, A. ANGELES, et al. A validated LC–MS/MS method for the quantitative measurement of creatinine as an endogenous biomarker in human plasma. *Bioanalysis*, 8 (2016), 1997-2005. doi: 10.4155/bio-2016-0086
- [50] H. KIM, C. SEO, Y. KIM, et al. Simultaneous Urinary Creatine and Creatinine Analysis by High Performance Liquid Chromatography. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 37 (2016), 756-758. doi: 10.1002/bkcs.10743

- [51] P. DEREZIŃSKI, A. KLUPCZYŃSKA, W. SAWICKI, et al. Creatinine Determination In Urine By Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry Method. *Acta Pol. Pharm.*, 73 (2016), 303-313.
- [52] S. FRASELLE, K. DE CREMER, W. COUCKE, et al. Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry method to measure creatinine in human urine. *J. Chromatogr. B*, 988 (2015), 88-97. doi: 10.1016/j.jchromb.2015.02.026
- [53] J. ZHAO. Simultaneous determination of plasma creatinine, uric acid, kynurenine and tryptophan by high-performance liquid chromatography: method validation and in application to the assessment of renal function. *Biomed. Chromatogr.*, 29 (2015), 410-415. doi: 10.1002/bmc.3291
- [54] A. K. HEWAVITHARANA, K. M. DARCH, N. P. SHAW. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometric Determination of Creatinine in Human Urine. *Anal. Lett.*, 47 (2014), 689-696. doi: 10.1080/00032719.2013.848363
- [55] M. V. ANTUNES, C. G. NIEDERAUER, R. LINDEN. Development, validation and clinical evaluation of a dried urine spot method for determination of hippuric acid and creatinine. *Clin. Biochem.*, 46 (2013), 1276-1280. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.07.004
- [56] S. ZHOU, R. ZUO, Z. ZHU, et al. An eco-friendly hydrophilic interaction HPLC method for the determination of renal function biomarkers, creatinine and uric acid, in human fluids. *Anal. Methods*, 5 (2013), 1307-1311. doi: 10.1039/c2ay26362a
- [57] J. ZHAO. A simple, rapid and reliable high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of creatinine and uric acid in plasma and urine. *Anal. Methods*, 5 (2013), 6781-6787. doi: 10.1039/c3ay41061g
- [58] Creatinine ELISA Kit. *Lsbio.com* [online]. [cit. 4. 4. 2020]. Dostupné z: <https://www.lsbio.com/elisakits/creatinine-elisa-kit-competitive-eia-ls-f25695/25695?trid=247>

- [59] M. FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, P. RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, E. M. AÑÓN ÁLVAREZ, et al. Simultaneous Determination of Creatinine and Creatine in Human Serum by Double-Spike Isotope Dilution Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) and Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS). *Anal. Chem.*, 87 (2015), 3755-3763. doi: 10.1021/acs.analchem.5b00769
- [60] N. NONTAWONG, M. AMATATONGCHAI, S. THIMOONNEE, et al. Novel amperometric flow-injection analysis of creatinine using a molecularly-imprinted polymer coated copper oxide nanoparticle-modified carbon-paste-electrode. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 175 (2019). doi: 10.1016/j.jpba.2019.07.018
- [61] L. VITALI, S. GONÇALVES, V. RODRIGUES, et al. Development of a fast method for simultaneous determination of hippuric acid, mandelic acid, and creatinine in urine by capillary zone electrophoresis using polymer multilayer-coated capillary. *Anal. Bioanal. Chem.*, 409 (2017), 1943-1950. doi: 10.1007/s00216-016-0142-4
- [62] W. GROCHOCKI, M. J. MARKUSZEWSKI, J. P. QUIRINO. Simultaneous determination of creatinine and acetate by capillary electrophoresis with contactless conductivity detector as a feasible approach for urinary tract infection diagnosis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 137 (2017), 178-181. doi: 10.1016/j.jpba.2017.01.032
- [63] W. ZHU, B. WEN, L. JIE, et al. Rapid and low-cost quantitative detection of creatinine in human urine with a portable Raman spectrometer. *Biosens. Bioelectron.*, 154 (2020). doi: 10.1016/j.bios.2020.112067
- [64] P. KUMAR, M. KAMBOJ, R. JAIWA, et al. Fabrication of an improved amperometric creatinine biosensor based on enzymes nanoparticles bound to Au electrode. *Biomarkers*, 24 (2019), 739-749. doi: 10.1080/1354750X.2019.1682045
- [65] E. L. FAVA, T. M. PRADO, A. GARCIA-FILHO, et al. Non-enzymatic electrochemical determination of creatinine using a novel screen-printed microcell. *Talanta*, 207 (2020). doi: 10.1016/j.talanta.2019.120277
- [66] L. NOVÁKOVÁ, M. DOUŠA, P. BLATNÝ, et al. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Hradec Králové: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3
- [67] *Český lékopis 2017, 1. díl*. Praha: Grada Publishing, 2017. ISBN 978-80-271-0500-7

- [68] S. CZAPLICKI, *Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds*. London: IntechOpen, 2013. ISBN 978-953-51-1074-3
- [69] N. CIBIČEK, J. VACEK. *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-3951-8
- [70] M. DOUŠA. *HPLC.cz* [online]. [cit. 7. 4. 2020]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz>
- [71] S. FANALI, P. R. HADDAD, C. F. POOLE, et al. *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*, Volume 1. Second Edition. Amsterdam: Elsevier, 2017. ISBN 978-0-12-805393-5
- [72] G. GRECO, T. LETZEL. Main Interactions and Influences of the Chromatographic Parameters in HILIC Separations. *J. Chromatogr. Sci.*, 51 (2013), 684-693. doi: 10.1093/chromsci/bmt015
- [73] V. R. MEYER. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. Fifth Edition. Chichester: John Wiley and Sons, 2010. ISBN 978-0470-682180
- [74] E. M. BORGES. Silica, Hybrid Silica, Hydride Silica and Non-Silica Stationary Phases for Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.*, 53 (2015), 580-597. doi: 10.1093/chromsci/bmu090
- [75] Z. ZAJÍČKOVÁ. Advances in the development and applications of organic-silica hybrid monoliths. *J. Sep. Sci.*, 40 (2017), 25-48. doi: 10.1002/jssc.201600774
- [76] M. JACOB, J. T. PRESLEY, S. LOMAS, et al. Achieving Ultra-High Performance in Preparative Chromatography with the Combination of Axia Packing and Kinetex Core-Shell Particle Technologies [online]. [cit. 10. 4. 2020]. Dostupné z: <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/3bcdb0b8-ac2b-4e73-b6a3-daa79ce57d28.pdf>
- [77] L. NOVÁKOVÁ, M. DOUŠA, P. BLATNÝ, et al. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Hradec Králové: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0
- [78] CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH. *Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods*, 1996, [online]. [cit. 10. 4. 2020]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/reviewer-guidance-validation-chromatographic-methods>