

# UNIVERZITA KARLOVA

## Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A FARMACEUTICKÉ  
ANALÝZY



Separace acikloviru a jeho degradačního produktu

Diplomová práce

Matěj Nodžák

PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.  
Hradec Králové 2021

Prohlášení autora:

*„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.“*

Author's Declaration:

*“I declare that this thesis is my original copyrighted work. All literature and other resources I used while processing are listed in the bibliography and properly cited. The thesis was not misused for obtaining the same or different academic degree.”*

V Hradci Králové, 22. srpna 2021



.....  
Matěj Nodžák

Na tomto místě bych moc rád poděkoval své školitelce a zároveň vedoucí této práce PharmDr. Pavle Pilařové, Ph.D. za velkou ochotu, vstřícnost a věnovaný čas při vedení a konzultacích. Poděkování patří také doc. PharmDr. Radimovi Kučerovi, Ph.D za jeho odborné rady a připomínky k práci na experimentální části. V neposlední řadě děkuji PharmDr. Petrovi Kastnerovi, Ph.D i všem ostatním pracovníkům katedry Farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy za jejich ochotu a pomoc.

Tato práce vznikla za podpory projektu SVV 260 547.

# Obsah

Abstrakt .....	6
Abstract.....	7
1. Úvod .....	8
2. Cíl práce.....	9
3. Teoretická část .....	10
3.1. Aciklovir a jeho vlastnosti .....	10
3.1.1. Chemické vlastnosti .....	10
3.1.2. Lékopisné požadavky .....	11
3.1.3. Farmakologické vlastnosti.....	11
3.1.4. Klinické údaje .....	13
3.1.5. Léčivé přípravky s obsahem acikloviru registrované v ČR.....	15
3.2. Guanin a jeho vlastnosti .....	16
3.3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie .....	17
3.3.1. Princip HPLC.....	17
3.3.2. Kapalinový chromatograf a jeho součásti .....	18
3.3.3. Metody HPLC separace – základní separační módy.....	19
3.3.4. Stacionární fáze.....	25
3.3.5. Detektory .....	30
3.3.6. Základní charakteristiky HPLC separačního procesu .....	34
4. Experimentální část.....	38
4.1. Přístroje, chemikálie a pomůcky.....	38
4.1.1. Chromatografický systém.....	38
4.1.2. Přístroje.....	38
4.1.3. Chemikálie.....	38
4.1.4. Pomůcky .....	39

4.2.	Obecné postupy.....	40
4.2.1.	Příprava vzorků pro analýzu.....	40
4.2.2.	Příprava roztoků.....	40
4.2.3.	Příprava mobilních fází.....	41
4.3.	Optimalizace podmínek HPLC separace.....	42
4.3.1.	Chromatografické podmínky.....	42
4.3.2.	Přednastavení chromatografického systému.....	42
5.	Výsledky a diskuse.....	43
5.1.	Vliv změny poměru vodné a organické složky mobilní fáze s obsahem kyseliny octové nebo kyseliny trifluoroctové jako pufrů.....	44
5.1.1.	Mobilní fáze s obsahem kyseliny octové.....	44
5.1.2.	Mobilní fáze s obsahem kyseliny trifluoroctové.....	56
5.1.3.	Koncentrace pufrů v mobilní fázi.....	65
5.1.4.	Souhrn výsledků s kyselinou octovou a kyselinou trifluoroctovou.....	67
5.2.	Vliv fluoridu amonného na retenci.....	69
5.3.	Vliv diethylaminu na retenci.....	73
5.4.	Vliv změny poměru v mobilní fázi s obsahem fosforečnanů.....	74
5.4.1.	Mobilní fáze s tlum. rozt. fosforečnanovým o pH 7,0 (2) dle ČL 2017....	74
5.4.2.	Mobilní fáze s fosforečnanovým pufrům s obsahem Na solí o pH 7,0.....	76
5.5.	Testování čistoty acikloviru.....	76
6.	Závěr.....	77
7.	Seznam použitých zkratk.....	79
8.	Seznam citované literatury.....	81

# Abstrakt

**Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy**

**Kandidát:** Matěj Nodžák

**Školitel:** PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Separace acikloviru a jeho degradačního produktu

Tato práce se zabývala testováním retenčního chování acikloviru a jeho degradačního produktu guaninu s využitím hydrofilní interakční kapalinové chromatografie (HILIC). Pro analýzu byla použita kolona obsahující porézní grafitizovaný uhlík (PGC) označovaná jako Hypercarb<sup>TM</sup>. Práce navazuje na poznatky diplomové práce Lucie Bouzkové (2016) a Lenky Teplé (2017), které se zabývaly retenčním chováním těchto analytů na zirkoniové koloně modifikované elementárním uhlíkem ZirChrom<sup>®</sup>-CARB. Byl zkoumán vliv přítomnosti 0,1% kyseliny octové a 0,1% kyseliny trifluoroctové v mobilních fázích na retenci acikloviru a guaninu. Dále byl sledován vliv koncentrace fluoridu amonného, diethylaminu a fosforečnanových pufrů v mobilních fázích na eluci analytů. Mobilní fáze obsahovaly také různá složení organické složky. Navíc byly použity i různé poměry mezi vodnou a organickou složkou. Mechanismus retence na použité koloně souvisí s mnoha faktory, je velmi komplexní a dosud nebyl plně objasněn. Grafitizovaný uhlík je i přes svou hydrofobicitu schopen vzájemně separovat polární analyty. Přítomnost kyseliny trifluoroctové v mobilní fázi ve většině případů zkrátila dobu analýzy a zlepšila symetrii píků. Naproti tomu použití fluoridu amonného a fosforečnanových pufrů se příliš neosvědčilo. S přidavkem methanolu do mobilní fáze se retence obou analytů výrazně zvýšila oproti mobilním fázím s acetonitrilem, resp. propan-2-olem.

# Abstract

**Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis**

**Candidate:** Matěj Nodžák

**Tutor:** PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

**Title of Thesis:** Separation of Aciclovir and its Degradation Product

This work investigated the retention behavior of aciclovir and its degradation product guanine using hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC). A column containing porous graphitized carbon (PGC) called Hypercarb<sup>TM</sup> was used for analysis. The work builds on the findings of the diploma thesis of Lucie Bouzková (2016) and Lenka Teplá (2017), which dealt with the retention behavior of these analytes on a zirconium column modified with elemental carbon ZirChrom<sup>®</sup>-CARB. The effect of the presence of 0.1% acetic acid and 0.1% trifluoroacetic acid in the mobile phases on the retention of aciclovir and guanine was investigated. Furthermore, the effect of concentration of ammonium fluoride, diethylamine and phosphate buffers in mobile phases on the elution of analytes was studied. The mobile phases also contained different compositions of the organic component. In addition, different ratios between the aqueous and organic components were used. The mechanism of retention on the used column is related to many factors, is very complex and has not been fully clarified yet. Despite its hydrophobicity, graphitized carbon is able to separate polar analytes from each other. The presence of trifluoroacetic acid in the mobile phase in most cases shortened the analysis time and improved the symmetry of the peaks. In contrast, the use of ammonium fluoride and phosphate buffers has not been very successful. With the addition of methanol to the mobile phase, the retention of both analytes increased significantly compared to the mobile phases without the presence of methanol. With the addition of methanol to the mobile phase, the retention of both analytes increased significantly compared to the mobile phases with acetonitrile, resp. propan-2-ol.

# 1. Úvod

Aciklovir je léčivo, které vykazuje inhibiční aktivitu proti lidským herpetickým virům. Ve virem nakažené buňce se pomocí enzymů aktivuje na aciklovir-trifosfát, který se zakomponuje do nově tvořené virové DNA a inhibuje tak její replikaci. S aciklovirem se lze setkat v různých lékových formách určených pro systémové či lokální podání. Hlavním rozkladným produktem, tedy nečistotou je guanin. Jedná se o purinovou dusíkatou bázi, která je součástí nukleotidů tvořících DNA a RNA.

V diplomové práci byla pro sledování retenčních charakteristik dvou výše zmíněných látek využita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s aplikací netradiční stacionární fáze. HPLC je důležitou součástí moderní farmaceutické analýzy, nachází široké uplatnění při výzkumu, vývoji a výrobě léčiv. Její použití je významné pro kvantitativní analýzu, identifikaci a separaci látek, tedy i určení nečistot léčiv. Hlavními výhodami HPLC jsou především rychlost a citlivost stanovení a také možnost automatizace s potřebou malého objemu vzorku.

HPLC systémy se v poslední době neustále vyvíjejí a inovují. Zásadní vliv na vývoj nových metod mají stacionární fáze, které jsou klíčovou součástí HPLC umožňující separaci látek. Kromě nejpoužívanějších stacionárních fází na bázi silikagelu se stále častěji prosazují i nové stacionární fáze. Mezi takové patří porézní grafitizovaný uhlík (PGC), který byl použit při této práci. PGC vykazuje vysokou stabilitu v celém rozsahu pH (0-14) a je odolný vůči teplotám do 200 °C. Naopak nevýhodou je jeho křehkost, těžce předvídatelná selektivita, horší tvary píků a nižší účinnost oproti sorbentům na bázi silikagelu. Tento typ stacionární fáze lze použít u chromatografického systému označovaného jako HILIC (hydrofilní interakční chromatografie), který umožňuje řešení problému společné analýzy polárních a nepolárních analytů.

PGC se vzhledem k nepolárním látkám chová podobně jako RP C18 vázaný silikagel. Retenční a selektivní chování grafitu k polárním sloučeninám je však velmi odlišné, a lze jej s výhodou použít i pro separaci velmi polárních látek.



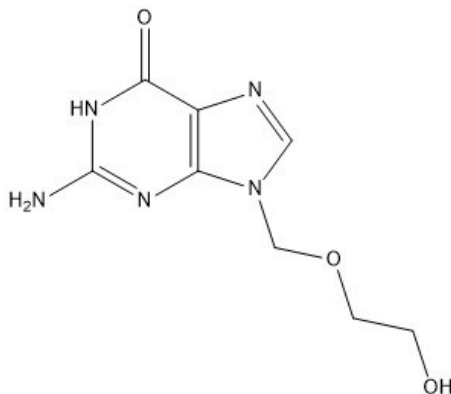
## 2. Cíl práce

Práce navazuje na poznatky diplomových prací Lucie Bouzkové (2016) [1] a Lenky Teplé (2017) [2], které se zabývaly retenčním chováním acikloviru a guaninu na zirkoniové koloně modifikované elementárním uhlíkem ZirChrom<sup>®</sup>-CARB s využitím HILIC systému. Cílem této práce bylo testování retenčního chování obou uvedených analytů na koloně obsahující porézní grafitizovaný uhlík (PGC) označované jako Hypercarb<sup>™</sup> a nalezení optimálních podmínek pro jejich separaci. Byl sledován vliv složení mobilních fází s různými poměry mezi vodnou a organickou složkou. Vyzkoušeny byly také různé pufry. Dále byla snaha porovnat retenční chování analytů na kolonách ZirChrom<sup>®</sup>-CARB a Hypercarb<sup>™</sup>.

## 3. Teoretická část

### 3.1. Aciklovir a jeho vlastnosti

#### 3.1.1. Chemické vlastnosti



$C_8H_{11}N_5O_3$

$M_r$  225,21 g/mol

CAS 59277-89-3

Systematický název: 2-amino-9-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-1,9-dihydro-6*H*-purin-6-on

Obsah: 98,5 % až 101,0 % sloučeniny  $C_8H_{11}N_5O_3$  (bezvodá látka).

#### Experimentálně zjištěné hodnoty:

- bod tání: 256,5 - 257,0 °C
- pKa: 2,27 (kyselá enolická skupina) a 9,25 (sekundární aminoskupina)

Jedná se o bílou až lehce nažloutlou krystalickou látku ve formě prášku. Je těžce rozpustná ve vodě (1,3 mg/ml, 25 °), velmi těžce rozpustná v 96% ethanolu (0,2 mg/ml) a prakticky nerozpustná v heptanu. Pro její rozpuštění je nutné použít zředěné roztoky minerálních kyselin a alkalických hydroxidů. Snadno rozpustný je také v dimethylsulfoxidu. [3; 4; 10]

### 3.1.2. Lékopisné požadavky

#### Zkoušky totožnosti:

- Infračervená absorpční spektrometrie (porovnání s Aciklovirem CRL)

#### Zkoušky na čistotu:

- Vzhled roztoku
- Příbuzné látky (s využitím kapalinové chromatografie)
- Semimikrostanovení vody
- Síranový popel
- Bakteriálních endotoxiny

#### Stanovení obsahu:

- titrace kyselinou chloristou 0,1 mol/l VS, bod ekvivalence se hodnotí potenciometricky.

#### Nečistoty:

- Nečistoty se stanovují zkouškou na příbuzné látky. Jako stacionární fáze je předepsán oktadecylsilylovaný silikagel (5 µm) ukotvený v koloně s délkou 25 cm a průměrem 4,6 mm. Mobilní fází A je směs acetonitrilu a tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 3,1 v poměru 1:99. Mobilní fáze B je směs acetonitrilu a tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 2,5 v poměru 50:50. Pro detekci je určen spektrofotometrický detektor (254 nm).
- ČL 2017 definuje 13 nečistot: A, B, C, F, G, I, J, K, N, O, P, Q a R, z nichž nečistota N a O nemají známou strukturu. Nečistotou B je guanin (viz 3.2.), který je zároveň rozkladným produktem acikloviru. [3]

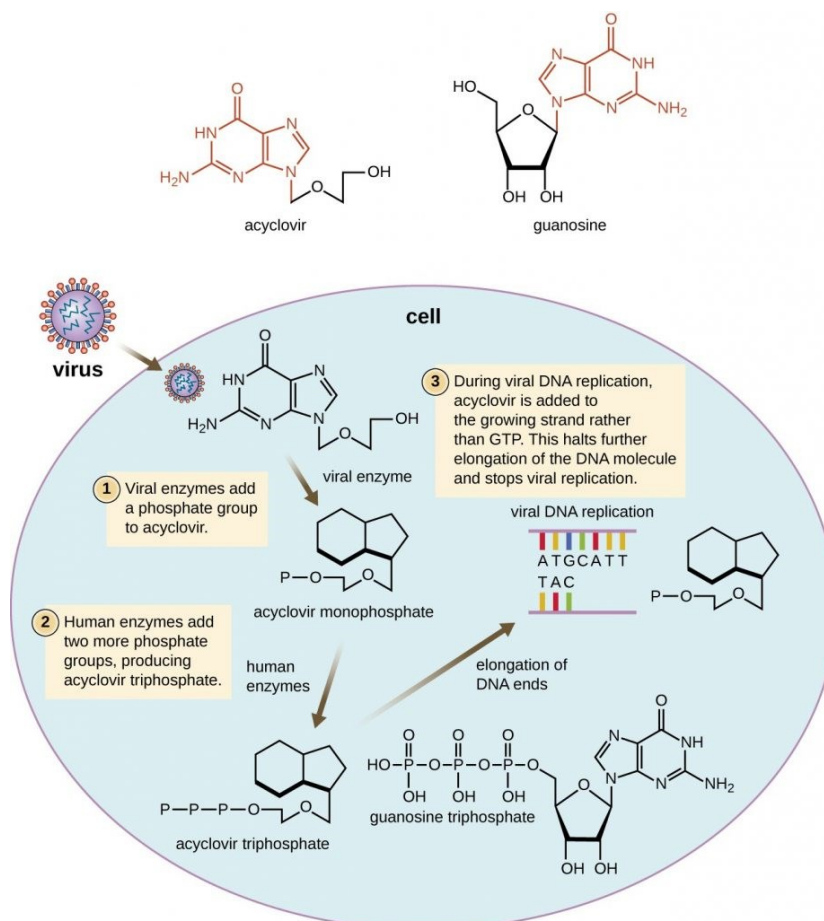
### 3.1.3. Farmakologické vlastnosti

#### 3.1.3.1. Farmakodynamické vlastnosti

Aciklovir je analog purinového nukleosidu syntetického původu odvozen od guaninu. Vykazuje inhibiční aktivitu proti lidským herpetickým virům: *herpes simplex 1* (HSV 1), *herpes simplex 2* (HSV 2), virus *varicella zoster* (VZV), virus *Epstein-Barrové* (EBV) a *cytomegalovirus* (CMV). Nejvyšší účinnost byla prokázána proti HSV 1 a naproti tomu nejnižší účinnost proti CMV, který spolu s EBV způsobuje infekční mononukleózu.

## Mechanismus účinku

Mechanismus účinku je znázorněn na obrázku 1. Po průniku do infikované buňky je aciklovir přeměněn na aciklovir-monofosfát. Tuto reakci katalyzuje virový enzym thymidin kináza (TK). Aciklovir-monofosfát je dále pomocí buněčné guanylát kinázy přeměněn na aciklovir-difosfát. Z této formy následně vzniká aciklovir-trifosfát pomocí dalších buněčných enzymů (nukleosid difosfát kinázy, kreatin kinázy, pyruvát kinázy, fosfoglycerát kinázy, sukcinyl-CoA syntetázy, adenylosukcinát syntetázy a fosfoenolpyruvát karboxykinázy). V této formě se již zapojuje do nově tvořené virové DNA. Narozdíl od guanosinu ale neobsahuje –OH skupinu v poloze 3', která je nutná k připojení dalšího nukleosidu do řetězce DNA. Působí navíc jako falešný substrát pro virovou DNA-polymerázou a inhibuje tak replikaci virové DNA.



Obrázek 1 Mechanismus účinku acikloviru  
[převzato ze zdroje 6]

Toxicita pro neinfikované buňky savců je nízká díky dvěma faktorům:

- Thymidin kináza neinfikovaných buněk aciklovir jako substrát nevyužívá.
- Aciklovir má vyšší afinitu k virové než k buněčné DNA-polymeráze. [5; 6; 7]

### 3.1.3.2. Farmakokinetické vlastnosti

Biodostupnost po perorálním podání se pohybuje mezi 10-20 %, navíc je dále snižována se zvyšující se dávkou. BAV není ovlivněna potravou.

Distribuční objem je 0,6 l/kg. Afinita k plazmatickým bílkovinám není klinicky významná (9-33 %). Aciklovir proniká také do likvoru a jeho koncentrace zde odpovídají 50 % hodnoty plazmatické koncentrace.

Aciklovir není příliš významně metabolizován.

Z méně než 15 % je alkoholdehydrogenázou a aldehyddehydrogenázou oxidován na 9-karboxymethoxymethylguanin.

Z 1 % je hydroxylován, za vzniku 8-hydroxy-9-(2-hydroxyethoxymethyl)guaninu (8-hydroxy-aciklovir).

Z 90 % je v nezměněné podobě vylučován ledvinami pomocí glomerulární filtrace a tubulární exkrece. Poločas se pohybuje v rozmezí 2-3 hodiny při normální funkci ledvin. U pacientů se sníženou funkcí ledvin je nutné dávku redukovat a dodržovat přiměřenou hydrataci. [8; 9; 10]

### 3.1.4. Klinické údaje

#### Indikace

Aciklovir je indikován k léčbě onemocnění způsobenými herpetickými virem. Jedná se o kožní či slizniční infekce, a také genitální infekce vyvolané virem *herpes simplex*. Dále je používán k léčbě planých neštovic (*varicella zoster*) a pásového oparu (*herpes zoster*). Využívá se k léčbě pacientů těžce imunokompromitovaných například v pokročilém stádiu onemocnění způsobeném HIV. K profylaxi herpetických infekcí se dále používá u pacientů podstupujících transplantaci kostní dřeně. Díky dobrému prostupu do mozkomíšního moku je využíván k léčbě herpetické encefalitidy. Ve formě oční masti slouží k léčbě keratitidy způsobené virem *herpes simplex*. [8; 9; 11]

#### Dávkování

U infekcí způsobených virem *herpes simplex* se obvykle podává ve formě tablet 200 mg 5× denně ve čtyřhodinových intervalech s vynecháním jedné noční dávky. Doba podávání je obvykle 5 dnů, ale při těžším průběhu může být prodloužena.

Při infekcích vyvolaných virem *herpes zoster* je nutno podávat dávky vyšší. Podává se po dobu jednoho týdne 800 mg 5× denně každé čtyři hodiny s vynecháním jedné noční

dávky. Tablety se doporučuje užívat s jídlem nebo bezprostředně po něm a zapít dostatečným množstvím tekutiny.

Obecně může být dávkování individuálně upravováno, a to hlavně u imunokompromitovaných pacientů, kde je nutno podávat dávky vyšší. U pacientů s poruchou funkce ledvin, obézních a starších pacientů je důležité dbát zvýšené opatrnosti a případně dávky redukovat. U pediatrické populace jsou dávky také snižovány. [5; 12]

### Kontraindikace

Použití je absolutně kontraindikováno u pacientů se známou hypersenzitivitou na aciklovir nebo pomocné látky používané v daných léčivých přípravcích. Relativní kontraindikací může být renální selhávání, stavy zvýšeného rizika vzniku trombocytopenické purpury a hemolyticko-uremického syndromu. [9; 13]

### Interakce

Léčiva, která se také eliminují renálně mohou snižovat renální clearance acikloviru a tím zvyšovat jeho plazmatické hladiny (např. probenecid a cimetidin). Pokud jsou společně užívána nefrotoxická léčiva (např.: aminoglykosidy, furosemid) a léčiva s rizikem tvorby krystalů v moči (např.: chinolony, sulfonamidy, inhibitory proteáz, metotrexát) zvyšuje se riziko poruchy funkce ledvin. V takovém případě je nutné sledovat renální funkce pacienta a na základě toho upravovat dávky. [15; 16]

### Nežádoucí účinky

Obecně je aciklovir považován za dobře snášené léčivo. Větší opatrnosti je třeba dbát u pacientů se sníženou funkcí ledvin a u starší populace. Poškození nebo akutní selhání ledvin se vyskytuje velmi vzácně a obvykle rychle reaguje na hydrataci pacienta, nebo včasné snížení dávky či vysazení léku. Aciklovir může z důvodu jeho nízké rozpustnosti v moči vyvolávat krystalovou nefropatii a urolitiázu. To se týká hlavně i.v. podávání vysokých dávek tohoto léčiva. [15; 16]

### Těhotenství a kojení

V průběhu těhotenství se má aciklovir užívat pouze po zvážení poměru terapeutického přínosu a rizika pro plod. Studiemi však nebyla prokázána žádná přímá souvislost mezi užíváním acikloviru v těhotenství a vrozenými vadami novorozenců. Léčivo ve významné míře přechází do mateřského mléka prostřednictvím pasivní difúze, proto se kojícím ženám doporučuje užívat jen v odůvodněných případech. [5; 9; 17]

### 3.1.5. Léčivé přípravky s obsahem acikloviru registrované v ČR

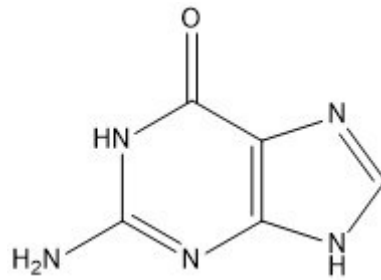
V ČR je aciklovir dostupný v intravenózních formách (infúze), topických formách (krémy, oční mast) a největší zastoupení zauímají tablety pro perorální podání v různých silách 200-800 mg. Dostupný je také kombinovaný přípravek Zovirax duo krém, který obsahuje kombinaci s hydrokortisonem.

Tabulka 1 shrnuje všechny aktuálně obchodované LP [18].

PERORÁLNÍ	INTRAVENÓZNÍ	TOPICKÉ
<b>LÉČIVÉ PŘÍPRAVKY S OBSAHEM ACIKLOVIRU OBCHODOVANÉ V ČR</b>		
NÁZEV LP	DRŽITEL ROZHODNUTÍ O REGISTRACI	
Aciclovir AL 50MG/G CRM 2G	STADA PHARMA CZ s.r.o.	
Aciclovir Aurovitas 200MG TBL NOB 25	Aurovitas spol. s r.o., Praha	
Aciclovir Aurovitas 400MG TBL NOB 25	Aurovitas spol. s r.o., Praha	
Aciclovir Olikla 250MG INF PLV SOL 5	CZ Pharma s.r.o., Kostelec nad Černými Lesy	
Aciclovir Olikla 250MG INF PLV SOL 10	CZ Pharma s.r.o., Kostelec nad Černými Lesy	
Acyclostad 50MG/G CRM 5G	STADA Arzneimittel AG, Německo	
Herpesin 200MG TBL NOB 25	Teva Pharmaceuticals CR, s.r.o., Praha	
Herpesin 400MG TBL NOB 25	Teva Pharmaceuticals CR, s.r.o., Praha	
Herpesin 50MG/G CRM 2G	Teva Pharmaceuticals CR, s.r.o., Praha	
Herpesin 50MG/G CRM 5G	Teva Pharmaceuticals CR, s.r.o., Praha	
Provirsan 200MG TBL NOB 30	PRO.MED.CS Praha a.s.	
Xorox 30MG/G OPH UNG 4,5G	AGEPHA Pharma s.r.o., Senec, SK	
Zovirax 200MG TBL NOB 25	GlaxoSmithKline (Ireland) Limited, Dublin	
Zovirax 400MG TBL NOB 25	GlaxoSmithKline (Ireland) Limited, Dublin	
Zovirax 800MG TBL NOB 35	GlaxoSmithKline (Ireland) Limited, Dublin	
Zovirax 50MG/G CRM 2G	GlaxoSmithKline Consumer Healthcare Czech Republic s.r.o., Praha	
Zovirax duo 50MG/G+10MG/G CRM 2G	GlaxoSmithKline Consumer Healthcare Czech Republic s.r.o., Praha	

Tabulka 1 LP s obsahem acikloviru obchodované v ČR (stav k 1.1. 2021) [18]

### 3.2. Guanin a jeho vlastnosti



$C_5H_5N_5O$

Mr 151,13 g/mol

CAS 73-40-5

Systematický název: 2-amino-1,7-dihydro-6*H*-purin-6-on

Experimentálně zjištěné hodnoty (dle databáze Drugbank.com):

- bod tání: 360 °C
- pKa: 2,22 a 8,95

Jedná se o purinovou dusíkatou bázi, která je součástí nukleotidů tvořících DNA a RNA. Je hlavním rozkladným produktem acikloviru. V lékopisných požadavcích na aciklovir (monografie ČL 2017) se označuje jako nečistota B. Guanin je téměř nerozpustný ve vodě (2,08 mg/ml) Pro jeho rozpuštění je nutné použít zředěné roztoky minerálních kyselin a alkalických hydroxidů. [1; 14; 3]



### 3.3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) patří mezi fyzikálně-chemické separační metody. Je jednou z nejpoužívanějších analytických metod současné doby s širokým využitím v různých oborech. Ve farmacii představuje velmi důležitý nástroj při výzkumu, vývoji, výrobě a kontrole kvality léčiv. Dále je využívána také pro klinické účely např. při terapeutickém monitorování léčiv (TDM). Je široce uplatňována v lékopisných monografiích. HPLC umožňuje separovat směsi látek a provádět jejich kvantitativní i kvalitativní analýzu. K hlavním výhodám HPLC patří rychlost, citlivost, selektivita, univerzálnost analýzy a nízká spotřeba analytu. Možnost automatizace pak usnadňuje analýzu větší série vzorků s minimálním zásahem operátora. [19; 20]

#### 3.3.1. Princip HPLC

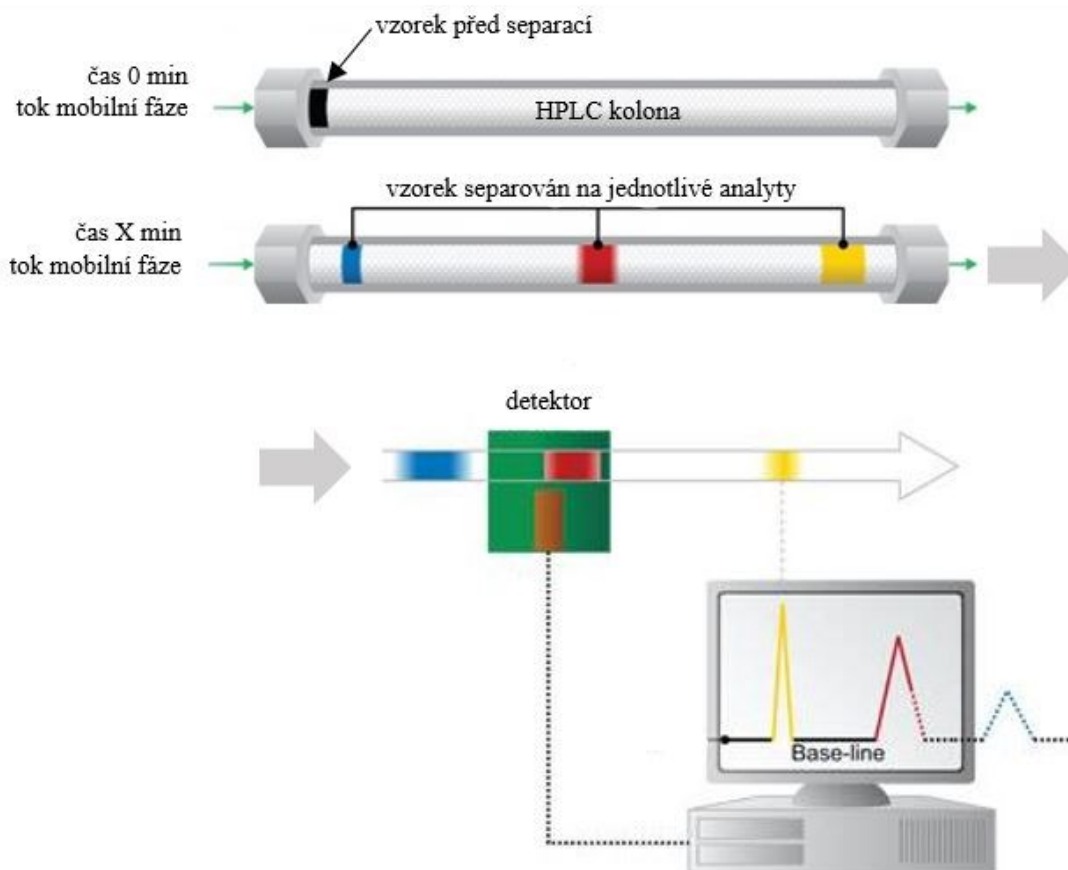
Chromatografie je separační metoda založená na principu dělení látek mezi dvěma fázemi: stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou). Stacionární fáze je ukotvena na chromatografické koloně ve formě sorbentu. Mobilní fáze unáší vzorek a protéká skrz tento sorbent. Během procesu dochází k mnohonásobnému opakovanému ustalování rovnováhy dělených látek mezi těmito dvěma fázemi. Tento jev lze popsat distribuční (rozdělovací) konstantou  $K_D$ :

$$K_D = \frac{c_s}{c_m}$$

$c_s$  – koncentrace látky ve stacionární fázi;  $c_m$  – koncentrace látky v mobilní fázi

Látky se slabší afinitou ke stacionární fázi mají nižší hodnotu  $K_D$  a jsou z kolony eluovány (vymyty) dříve. Naproti tomu látky se silnějšími interakcemi se sorbentem mají vyšší  $K_D$  a jsou eluovány později. Tak se vzorek přivedený na kolonu postupně rozděluje na jednotlivé zóny analytů. Zóny jsou po eluci z kolony vedeny k detektoru, kde je příslušný signál zaznamenán ve formě píku zobrazeném na záznamu, který se nazývá chromatogram (časová závislost intenzity signálu). Plocha píku (kvantitativní parametr) přímo odpovídá koncentraci analytu ve stanovovaném vzorku. Retenční čas píku (kvalitativní parametr) charakterizuje daný analyt.

Eluce může být provedena s použitím mobilní fáze o konstantním složení, tzv. izokratická eluce, nebo lze použít gradientovou eluci, kdy se v čase mění eluční síla mobilní fáze. Gradientová eluce je využívána pro separaci směsi látek s odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Základní princip HPLC je popsán na obrázku 2. [22; 23; 19; 21; 2]

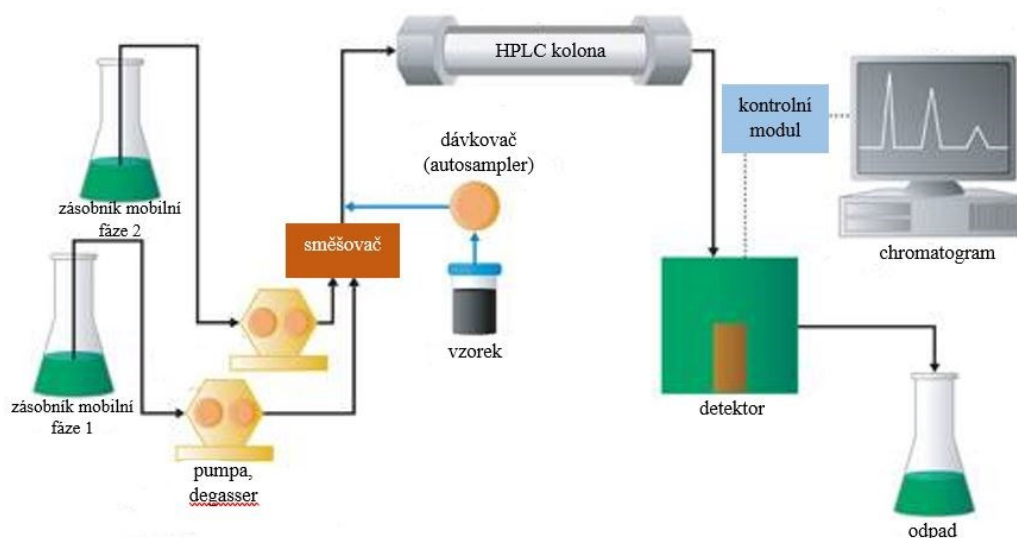


*Obrázek 2 Princip HPLC separace*  
[převzato a upraveno ze zdroje 25]

### 3.3.2. Kapalinový chromatograf a jeho součásti

Mobilní fáze je ze zásobníku pumpována do celého systému HPLC. Pokud chceme využít gradientové eluce, je nutné do systému zapojit i další zásobník mobilní fáze a další pumpu. Pumpa zajišťuje kontinuální průtok mobilní fáze s minimalizací pulzací. Směšovač umožňuje mísení více mobilních fází v předem nastaveném poměru. Do proudu mobilní fáze je nastříknut vzorek, nejčastěji pomocí autosampleru (umožňuje automatický nástřik přesně daného objemu vzorku). Následně je vzorek unášen skrz HPLC kolonu, kde dochází k separaci vzorku na jednotlivé složky. Za kolonou je umístěn detektor, který umožňuje zaznamenat signál jednotlivých složek.

Signál je zpracován v kontrolní jednotce, vyhodnocen a zaznamenán pomocí PC softwaru. Základní schéma celého chromatografického systému HPLC je znázorněno na obrázku 3. [2; 22; 25; 24]



Obrázek 3 Základní schéma HPLC  
[převzato a upraveno ze zdroje 25]

### 3.3.3. Metody HPLC separace – základní separační módy

#### 3.3.3.1. Chromatografie na normálních fázích (NP-HPLC)

Jedná se o původní HPLC metodu, která využívá polární stacionární fázi. Mobilní fáze disponuje polaritou nižší. Jako stacionární fáze se nejčastěji používá oxid křemičitý ( $\text{SiO}_2$ ) ve formě silikagelu nebo oxid hlinitý ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). Tyto materiály pak mohou být dále upravovány navázáním polárních funkčních skupin (viz 3.3.4.). Pro přípravu mobilní fáze se používají směsi organických nepolárních rozpouštědel (chloroform, hexan) s malým přídavkem polárního rozpouštědla (methanol, ethanol). Mechanismus retence je založen na polárních interakcích (vodíkové můstky, dipól-dipól interakce). Pro dosažení reprodukovatelných výsledků je důležité, aby použitá rozpouštědla byla bezvodá. Platí, že čím je polarita molekuly analytu vyšší, tím je na koloně zadržován déle a má delší retenční čas ( $t_R$ ). S rostoucí polaritou složek mobilní fáze retence analytu klesá. Tento typ separace lze tedy použít především pro analýzu polárních látek, látek citlivých na přítomnost vody, lipofilních látek (lipidy, vitamín K), izomerů (retinoly, tokoferoly).

Využití normálních fází je v současné době potlačováno ve prospěch novějších HPLC metod, které mají řadu výhod a není při nich nutné pracovat s většími objemy organických nepolárních rozpouštědel, která zatěžují životní prostředí. [26; 22; 21; 24]

### 3.3.3.2. Chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC)

Chromatografie na reverzních fázích patří mezi nejčastěji využívaný mód HPLC. Použitá stacionární fáze má nepolární charakter. Nejčastěji se jedná o modifikovaný silikagel, nebo oxidy kovů s navázanými hydrofobními funkčními skupinami (např. řetězce C8, C18, fenyl). Mobilní fáze je polární. Obvykle se jedná o směs polárních organických rozpouštědel (methanol, acetonitril, tetrahydrofuran) s vodnou složkou, která bývá pufrována. Hlavní mechanismus retence spočívá v hydrofobních interakcích mezi molekulami analytu a povrchem stacionární fáze. Pořadí eluce analytů je tedy v porovnání s NP-HPLC obrácené. Méně polární látky jsou na stacionární fázi zadržovány déle než látky polárnějšího charakteru. [26; 2; 21; 24]

### 3.3.3.3. Ionově výměnná chromatografie (IEC)

V tomto případě je součástí stacionární fáze iontová nebo ionizovatelná skupina (tzv. ionex). Tato skupina nese oproti separovanému analytu opačný náboj. Pokud se jedná o skupinu se záporným nábojem (např. karboxylová, sulfoskupina), je označována jako katex a zachytává kationty analytu. Jestliže se jedná o skupinu s kladným nábojem (např. aminoskupina), pak se jedná o anex, který zachytává anionty analytu. Mobilní fáze obsahuje ionty, které mají stejný náboj jako analyt. Tyto ionty se označují jako tzv. protiionty. IEC je založena na silných elektrostatických interakcích, které působí mezi ionizovanými funkčními skupinami iontoměnič (stacionární fáze) a opačně nabitými ionty v okolním roztoku (mobilní fáze). Tento typ chromatografie se využívá k separaci iontů a analytů, které je možné ionizovat (např. peptidy, nukleové kyseliny). [22; 1; 2; 23; 28]

### 3.3.3.4. Chirální chromatografie

Jedná se o důležitou metodu pro analýzu opticky aktivních látek. Enantiomery mají stejné fyzikálně-chemické vlastnosti a nelze je od sebe v achirálním prostředí rozdělit. Metoda spočívá v jejich přeměně na diastereomery, které se již ve svých fyzikálně-chemických vlastnostech vzájemně liší. Tento proces lze provést dvěma způsoby.

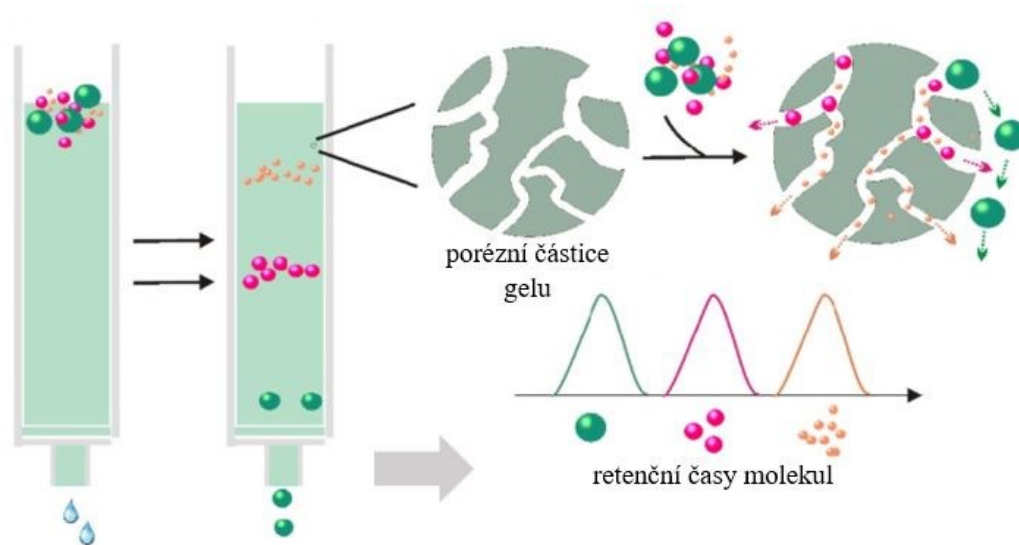
Nepřímá separace – Analyt v podobě páru enantiomerů je pomocí opticky čistého derivatizačního činidla převeden na diastereomery, které je možné separovat v achirálním prostředí HPLC systému.

Přímá separace – Vznikají dočasné diastereomerní komplexy tvořené interakcí mezi enantiomerem analytu a chirální stacionární fází (CSP) nebo chirálním selektorem

v mobilní fázi. Povrch CSP je tvořen opticky aktivními látky např. cyklodextriny, proteiny, polysacharidy, makrocyclickými antibiotiky. Pokud je chirální selektor součástí mobilní fáze, pak lze použít achirálním stacionární fázi. [21; 26]

### 3.3.3.5. Molekulová vylučovací chromatografie (SEC)

Bývá označována také jako gelová chromatografie. Dochází při ní k dělení látek dle velikosti jejich molekul. Na rozdíl od ostatních separačních metod by při tomto procesu nemělo docházet k žádným interakcím mezi analytem a stacionární fázi, která je často tvořena gelem. Rozmezí velikostí pórů je určující pro rozmezí velikosti molekul, pro něž lze provádět separaci. Molekuly, které jsou větší než póry, migrují pouze v prostoru mezi částicemi gelu, aniž by byly jakkoliv zadržovány a jsou eluovány s exkluzním neboli mrtvým objemem ( $V_0$ ). Velmi malé molekuly, které pronikají do všech pórů jsou eluovány s celkovým permeačním objemem ( $V_t$ ). K separaci dle velikosti molekul dochází mezi exkluzním a celkovým permeačním objemem. Menší molekuly mají delší retenční čas, naproti tomu větší molekuly jsou z kolony eluovány dříve. Princip SEC separace je znázorněn na obrázku 4.



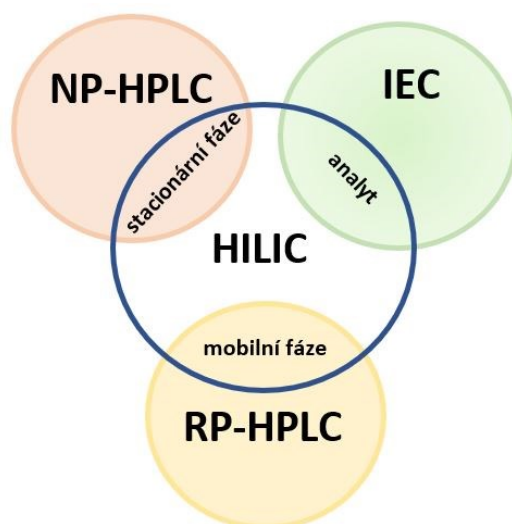
Obrázek 4 Princip separace SEC  
[převzato a upraveno ze zdroje 27]

SEC se využívá především pro určení molekulové hmotnosti ( $M_r$ ) a distribuce velikosti molekul polymerních látek. Dále je možné použití při purifikaci a dělení látek s velkým rozdílem  $M_r$ . [22; 3; 28]

### 3.3.3.6. Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)

HILIC (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) je chromatografická metoda určená pro separaci polárních hydrofilních sloučenin. Jedná se o alternativu k NP-HPLC, její mechanismus separace je však mnohem složitější a komplexnější. Díky relativně polární mobilní fázi nedochází k problémům s rozpustností polárních analytů v této fázi. Navíc nepoužívá toxická organická rozpouštědla. HILIC má také mnoho výhod oproti široce využívané RP-HPLC, u které se velmi polární látky eluují v blízkosti mrtvého retenčního času

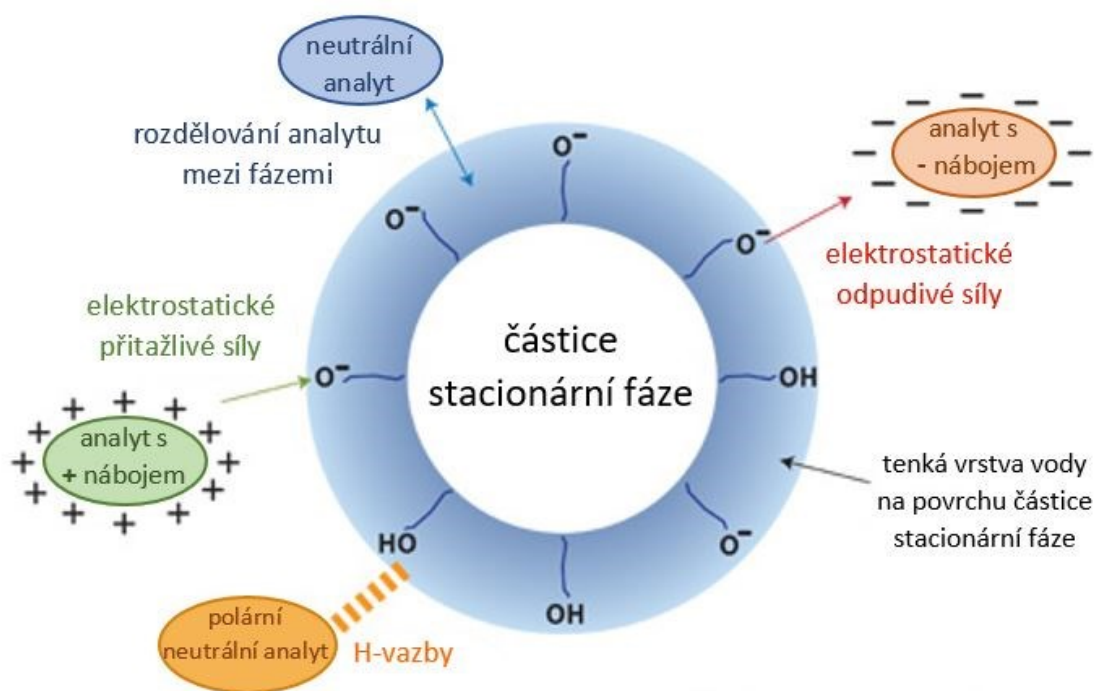
Využívá polární stacionární fáze, které jsou běžné pro NP-HPLC, mobilní fáze svými vlastnostmi odpovídá RP-HPLC módu. HILIC navíc umožňuje analýzu nabitých látek podobně jako IEC. [22; 26]



Obrázek 5 Kombinace vlastností více chromatografických metod v rámci HILIC  
[vytvořeno podle zdroje 2]

#### Mechanismus HILIC separace

Mechanismus separace je velmi komplexní a stále není plně objasněn. Uplatňují se při něm elektrostatické interakce, vodíkové vazby. Dále dochází také k rozdělování analytu mezi hydrofobní část mobilní fáze a silně hydrofilní vrstvu vody imobilizované na povrchu polární nebo polarizované stacionární fáze. Na tomto povrchu se utváří difuzní vrstva s gradientem koncentrace vody směrem do mobilní fáze. Stacionární fáze se tak chová jako „přenašeč“ vody. Tento mechanismus má však i své výjimky, které v současnosti nejsou dostatečně prostudované. Základní interakce v systému HILIC jsou znázorněny na další straně na obrázku 6. [22; 23; 30, 31]



Obrázek 6 Princip HILIC separace  
[upraveno ze zdroje 29]

#### Stacionární fáze pro HILIC separaci

Jak již bylo sděleno, stacionární fáze používané při HILIC separacích jsou polární a lze je rozdělit do tří skupin.

**Neutrální** – bez elektrostatických interakcí (amid, cyklodextrin).

**Nabité** – se silnými elektrostatickými interakcemi (silikagel, silikagel modifikovaný aminopropylovou funkční skupinou).

**Zwitterionty** – se slabými elektrostatickými interakcemi (sulfobetain, ZIC-HILIC).

Nejpoužívanější jsou nabité stacionární fáze na bázi silikagelu. Pro vyšší retenci a selektivní separaci bazických analytů je vhodnější stacionární fáze modifikovaná amidovou skupinou nebo sulfobetainovou skupinou. Kyselé látky mají vyšší retenci na propylaminové stacionární fázi, a to díky iontovým interakcím aminoskupin s negativně nabitou skupinou kyselých analytů. Dále se s výhodou používají stacionární fáze na bázi oxidů kovů ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ZrO}_2$ ), porézního grafitizovaného uhlíku, polymerní a hybridní stacionární fáze. [22; 32, 2, 33]

### Mobilní fáze pro HILIC separaci

Jako mobilní fáze se používají směsi polárních organických rozpouštědel (nejčastěji acetonitril) s vodou. Vodná složka bývá pufována na požadovanou hodnotu pH. Aby byly zachovány podmínky pro HILIC, musí být obsah vodné složky alespoň 2,5 %. V některých případech lze vodu zcela nahradit jiným polárním rozpouštědlem (methanol, ethanol, propan-2-ol). Takový systém je označován jako nevodná HILIC (NA-HILIC, *non-aqueous HILIC*). Výběr organického rozpouštědla pro mobilní fázi významně ovlivňuje retenci. Eluční síla se obecně zvyšuje s rostoucí polaritou a schopností rozpouštědla poskytovat proton-donor/ proton-akceptorové interakce. Rostoucí eluční sílu vyjadřuje eluotropická řada:

**acetonitril → tetrahydrofuran → propan-2-ol → ethanol → methanol → voda**

[22; 2]

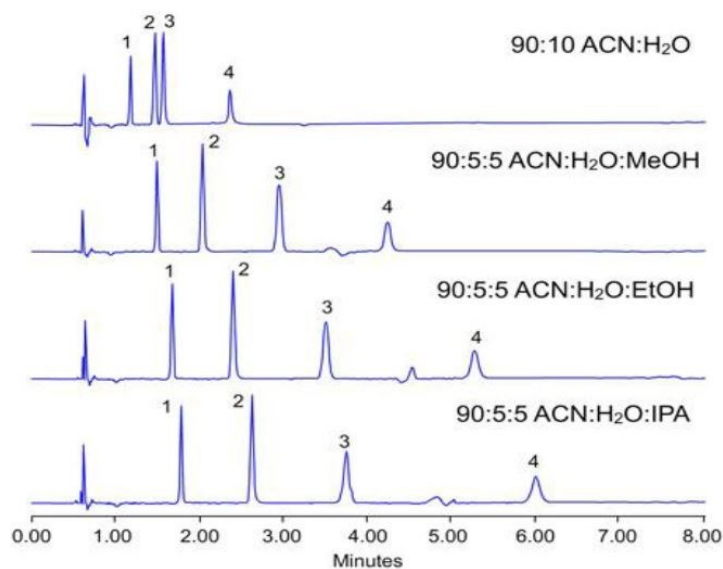
### Rozpouštědlo vzorku a dávkový objem

Významný vliv na separaci a selektivitu má také rozpouštědlo použité při přípravě vzorku, které by mělo mít stejné nebo podobné složení jako mobilní fáze. Pokud je vzorek rozpuštěn v rozpouštědle s vysokým obsahem vody, dochází ke snížení retence, štěpení píků a ztrátě účinnosti separace. Dále je pro separační účinnost a tvar chromatografických píků důležité dávkovat do systému co nejnižší objem vzorku. Dávkování vysokých objemů způsobuje rozmývání píků a tím snižuje separační účinnost. [45; 22]

### Selektivita HILIC separace

Selektivita je závislá na složení stacionární i mobilní fáze. Retence analytu se zvyšuje s jeho rostoucí polaritou a zároveň klesá s rostoucím podílem vodné složky v mobilní fázi. Pro ovlivnění retence lze k mobilní fázi přidávat pufr. Retence obvykle klesá se zvyšující se koncentrací solí. S rostoucím obsahem organické složky může docházet ke srážení těchto solí. V tomto případě je nutné jejich koncentraci v mobilní fázi snížit. Pokud dochází k disociaci analytu, jeho retence se zvyšuje v porovnání s neutrální formou. Jak vyplývá z eluotropická řady, voda je v HILIC módu nejsilnějším eluentem. Již malé zvýšení koncentrace vody v mobilní fázi vede k významnému snížení retence analytu. Obrázek 7 na následující straně znázorňuje, jak změna složení mobilní fáze ovlivňuje retenci. [22; 1]





Obrázek 7 Ovlivnění selektivity HILIC separace úpravou složení mobilní fáze [převzato ze zdroje 22]

#### Aplikace metody HILIC v praxi

HILIC separační mód je významný pro separaci vysoce polárních látek, které jsou při široce využívané RP-HPLC eluovány v blízkosti mrtvého retenčního času. V praxi se jedná o nukleotidy, bílkoviny, sacharidy, biologicky aktivní látky atd. [33; 22]

#### 3.3.4. Stacionární fáze

Stacionární fáze je nepohyblivou složkou HPLC systému. Tvoří náplň chromatografické kolony a je základním prvkem pro separaci. Jedná se o pevnou látku nebo tenkou vrstvu kapaliny vázanou na matrici. Existuje velké množství typů, které lze rozdělit do skupin dle různých vlastností a použití. Z pohledu chemického složení, je lze rozdělit na anorganické oxidy (silikagel,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ ), polymerní, hybridní stacionární fáze a stacionární fáze na bázi porézního grafitizovaného uhlíku (PGC). Tyto formy pak mohou být dále modifikovány vazbou funkčních skupin na jejich povrch.

Mezi základní parametry pro výběr kolon se stacionární fází patří velikost a tvar částic, objem a velikost pórů, specifický povrch a také délka kolony. Důležité je brát ohled i na chemickou a tepelnou stabilitu materiálu. [33; 22]

#### 3.3.4.1. Silikagel

Silikagel (oxid křemičitý,  $\text{SiO}_2$ ) je nejrozšířenějším polárním anorganickým materiálem pro výrobu sorbentů. Povrch tohoto materiálu je pokrytý silanolovými skupinami Si-OH, které jsou aktivními centry. Tyto skupiny zapříčiňují, že povrch silikagelu je slabě kyselý. Bazické látky jsou tak zadržovány více než kyselé a neutrální. Navíc díky nim vykazuje silikagel vlastnosti iontoměniče. V pufovaných mobilních fázích dochází k výměně protonů Si-OH skupin za kationty pufru a tento proces závisí na pH.

Silanolové skupiny jsou reaktivní. Díky tomu je možné na ně navázat různé funkční skupiny. Tímto způsobem lze povrch modifikovat a upravovat tak jeho charakter:

Polární charakter:	-OH, -NH <sub>2</sub> , -CN, -NO <sub>2</sub>	→	NP-HPLC
Nepolární charakter:	-C <sub>8</sub> , -C <sub>18</sub> , -fenyl	→	RP-HPLC
Iontový charakter:	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , COO <sup>-</sup>	→	IEC

[26; 22; 33]

#### 3.3.4.2. Oxidy kovů

Tyto stacionární fáze patří mezi polární anorganické sorbenty. Jako sorbent pro HPLC se využívá oxid zirkoničitý ( $\text{ZrO}_2$ ), hlinitý ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), titaničitý ( $\text{TiO}_2$ ). Tyto materiály jsou odolnější než silikagel. Vykazují vysokou stabilitu při pH 0-13 a jsou odolné vůči vysokým teplotám. Jejich povrchové vlastnosti jsou mnohem složitější, než je tomu u silikagelu. Toho lze s výhodou využít pro získání odlišné selektivity.

Nejčastěji používaným je oxid zirkoničitý. V závislosti na pH se chová jako amfoterní měnič pro kationty nebo anionty. Na povrchu má kromě -OH skupin také adsorpční centra. Tyto centra mají charakter Lewisových kyselin a jejich přítomnost vyžaduje přidání pufru do mobilní fáze. Pufr tak kompenzuje silné interakce těchto center s hydroxylovými, fosfátovými nebo karboxylovými skupinami molekuly analytu. O typu interakcí rozhoduje více faktorů, např. vlastnosti analytu, pH a typ pufru.

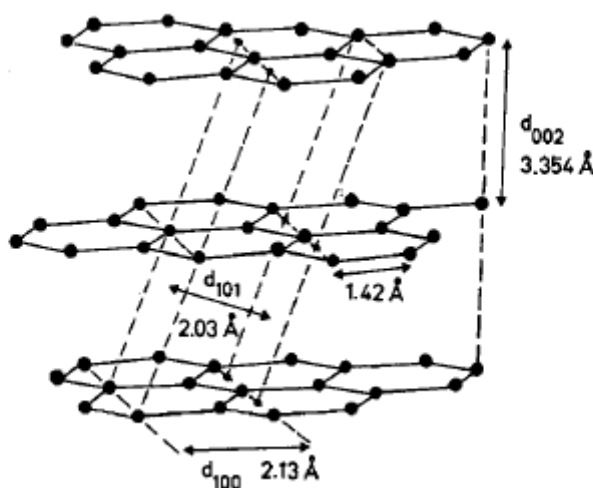
Pro mnoho interakcí lze oxid zirkoničitý používat v několika chromatografických módech. Nemodifikovaný  $\text{ZrO}_2$  se používá v systému NP-HPLC. Častější je použití při RP-HPLC, IEC nebo HILIC analýze. Povrch bývá modifikován tenkou vrstvou polybutadienu, polystyrenu nebo pyrolyticky vyloučeného uhlíku. [26; 2; 1; 33; 34]

Při předešlých pracích Lucie Bouzkové (2016) [1] a Lenky Teplé (2017) [2] byla použita kolona  $\text{ZrO}_2$  potažená vrstvou uhlíku označovaná jako ZirChrom<sup>®</sup> – CARB.

### 3.3.4.3. Porézní grafitizovaný uhlík (PGC)

PGC (*porous graphitic carbon*) se vzhledem k nepolárním látkám se PGC chová podobně jako RP C18 vázaný silikagel. V porovnání s ním však vykazuje nižší kapacitu kolony a nižší účinnost. Naproti tomu nabízí výhodu vyšší chemické a tepelné stability. Umožňuje separaci látek s podobnou hydrofobicitou. Jeho povrch je stereoselektivní, a tak může být využíván k separaci strukturálně podobných látek a geometrických izomerů. Retenční a selektivní chování k polárním sloučeninám je ale velmi odlišné od RP C18 silikagelu, a tak lze PGC s výhodou použít i pro separaci velmi polárních látek. [38; 21; 35; 36]

Obrázek 8 znázorňuje strukturu grafitu. Na molekulární úrovni je tvořen vrstvami hexagonálně uspořádaných atomů uhlíku spojených konjugovanými vazbami.

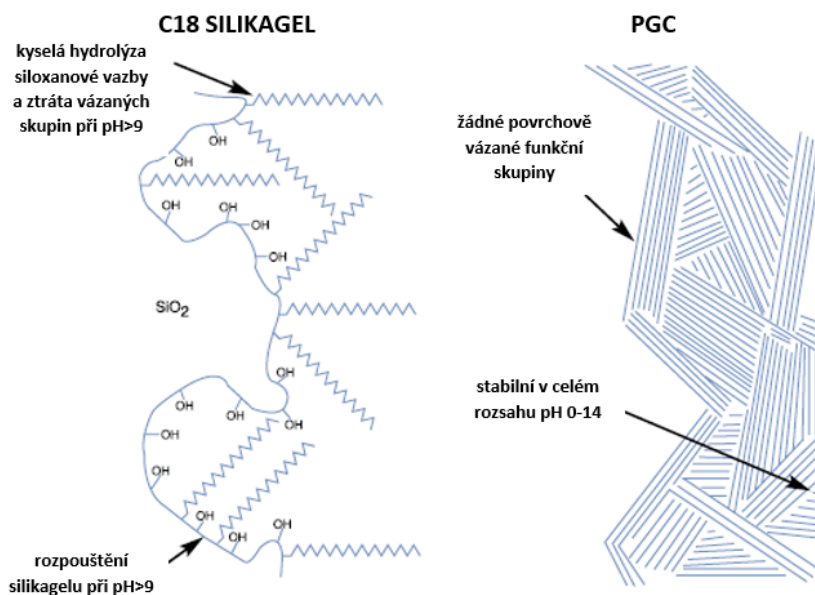


Obrázek 8 Struktura PGC  
[převzato ze zdroje21]

#### Fyzikální a chemické vlastnosti

Základní fyzikální vlastnosti jsou shrnuty v tabulce 2 na následující straně. PGC vykazuje vysokou stabilitu v celém rozsahu pH (0-14) a je odolný vůči teplotám do 200 °C. Nevýhodou je jeho křehkost, těžce předvídatelná selektivita, horší tvary píků a nižší účinnost oproti sorbentům na bázi silikagelu. Problémem může být i to, že tento sorbent vyžaduje vysoce čisté mobilní fáze a důkladnou úpravu vzorku před analýzou. Nečistoty se mohou silně vázat na sorbent a postupným vymýváním zvyšovat šum pozadí. V některých případech může dojít také k ireverzibilnímu snížení účinnosti kolony.

Částice jsou sférické a plně porézní s porozitou 75 %. Povrch je krystalický, planární, neobsahuje mikropóry a ani žádné navázané funkční skupiny. Obrázek 9 na následující straně znázorňuje porovnání struktury povrchu PGC a RP C18 silikagelu. [26; 35; 39; 21; 36]



Obrázek 9 Porovnání základní struktury RP C18 silikagelu a PGC  
[převzato a upraveno ze zdroje 37]

VLASTNOSTI		SPLNĚNÍ POŽADAVKU
tvar částic	sférické, plně porézní	bez výskytu mikropórů
specifická plocha povrchu	120 m <sup>2</sup> /g	linearita retence
medián průměru pórů	250 Å	přenos hmoty pro různé tvary a velikosti molekul analytu
objem pórů	0,7 m <sup>3</sup> /g	
průměr částic	3,5 μm	analytická HPLC
	7 μm	preparativní HPLC
	30 μm	aplikace SPE
porozita	75 %	přenos hmoty
% C	100 %	chemická stabilita
mechanická síla	> 400 bar	stabilita při použití vysokých tlaků

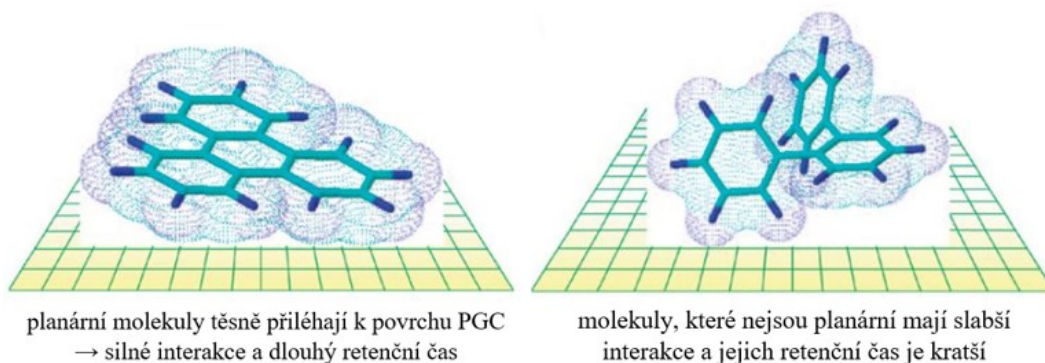
Tabulka 2 Základní vlastnosti PGC stacionární fáze [35]

### Retenční mechanismus

Retenční mechanismus dosud nebyl plně objasněn. Je založen na kombinaci dvou faktorů.

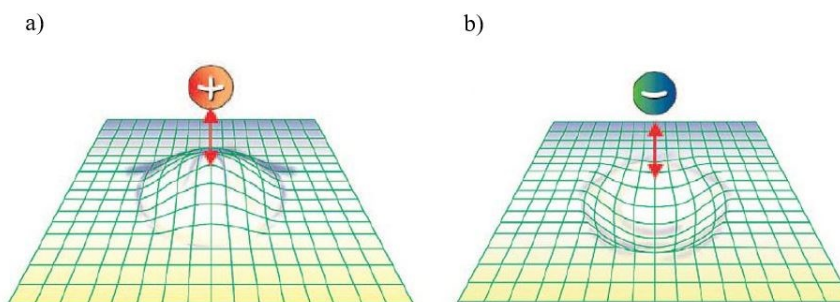
- 1) Disperzní síly mezi analytem a mobilní fází nebo analytem a povrchem grafitu → retence se zvyšuje s klesající polaritou analytu.
- 2) Nábojem indukované interakce polarizovatelných nebo polárních funkčních skupin analytu s polarizovatelným povrchem grafitu zahrnujícím delokalizované  $\pi$ -elektrony → retence se zvyšuje s rostoucí polaritou analytu.

Tyto faktory jsou ovlivněny polaritou i planaritou analytu. Síla interakce závisí na ploše molekuly analytu, která se dostává do kontaktu s grafitem. a typu funkčních skupin v bodě interakce. Čím planárnější je molekula analytu, tím více se přiblíží k povrchu grafitu a tím vyšší je počet interakčních bodů (viz obrázek 10).



Obrázek 10 Interakce analytu s povrchem PGC stacionární fáze  
[převzato a upraveno ze zdroje 35]

Polární látky mohou být na grafitu zadržovány i přestože se jedná o hydrofóbní materiál. Tento jev se nazývá efekt polárního zadržování na grafitu (PREG – *the polar retention effect on graphite*). PREG umožňuje separaci vysoce polárních látek, kterou není možné provést na RP C18 silikagelových fázích. Definiuje schopnost molekul, které mají osamocené pár (*lone pair*) nebo elektrony aromatického kruhu, interagovat prostřednictvím mechanismu přenosu elektronů do elektronového mraku grafitu. PREG je výrazný zvláště pokud jsou polární skupiny analytu připojeny na benzenový kruh či větší aromatické systémy. Polarizovatelnost povrchu grafitu je tedy zásadní pro retenci polárních látek (viz obrázek 11). [36; 38; 39; 37]



Obrázek 11 Nábojem indukované dipól-dipól interakce mezi povrchem PGC a pozitivním (a); negativním (b) nábojem analytu  
[převzato a upraveno ze zdroje 35]

V experimentální části této práce byla použita kolona s PGC označovaná jako Hypercarb<sup>TM</sup> od výrobce Thermo Fisher Scientific Inc. (detailnější informace o použitém instrumentu jsou shrnuty v kapitole 4.1.1.).

### 3.3.5. Detektory

Detektory zaznamenávají rozdíl mezi signálem při průchodu čisté mobilní fáze a mobilní fáze s obsahem analytu. Převádějí fyzikální nebo chemické vlastnosti analytu na elektrický signál, který je přímo úměrný koncentraci analytu.

Ideální detektor by měl vykazovat univerzálnost, specifitu a být schopen poskytnout vysoce citlivou a reprodukovatelnou odezvu. Ta by neměla být závislá na průtoku a složení mobilní fáze, což je velmi podstatné při gradientové eluci. Ovlivněna by neměla být ani změnou teploty. Dále by měl ideálně vykazovat široký lineární dynamický rozsah, což je rozsah koncentrací, ve kterém je odezva úměrná koncentraci analytu. Mezi důležité schopnosti patří také schopnost detektoru poskytnout kvalitativní informace o analytu. V praxi však žádný detektor nemá absolutně ideální vlastnosti, obtížné je především dosažení vysoké specifity a zároveň univerzálnosti. Výběr detektoru závisí především na vlastnostech analytu a preferovaných požadavcích na analýzu.

Běžně využívané pro HPLC jsou UV/VIS a fluorimetrické detektory, které bývají čím dál častěji vytlačovány moderními hmotnostními spektrometry. Základní HPLC detektory jsou shrnuty v tabulce 3. [22; 41]

	TYPICKÉ ANALYTY	GRADIENTOVÁ ELUCE
<b>UNIVERZÁLNÍ DETEKTORY</b>		
hmotnostně spektrometrický detektor (MS)	většina látek	ANO
refraktometrický detektor (RID)	cukry, polymery, triglyceridy, organické kyseliny	NE
detektor rozptylu světla (ELSD)	netěkavé látky bez chromoforu	ANO
detektor nabitých částic (CAD)	netěkavé látky bez chromoforu	ANO
<b>SPECIFICKÉ DETEKTORY</b>		
spektrofotometrický detektor (UV/VIS)	látky obsahující chromofor	ANO
fluorimetrický detektor (FD)	látky vykazující fluorescenci	ANO
elektrochemický detektor (ECD) – amperometrický/ coulometrický	látky schopné oxidace/ redukce	NE
radiometrický detektor (RAD)	radioaktivně značené látky	ANO

Tabulka 3 Nejběžnější HPLC detektory [22; 41]

### 3.3.5.1. Spektrofotometrické UV/VIS detektory

Jsou založeny na schopnosti látek absorbovat záření v ultrafialové (200-400 nm) nebo viditelné (400-760 nm) oblasti spektra. Elektromagnetické záření těchto vlnových délek způsobuje přechod elektronů do vyšších energetických hladin. Excitovány jsou především  $\pi$ -elektrony. Pro absorpci v oblasti UV/ VIS je tedy zásadní, aby molekula obsahovala tzv. chromofor (dvojně, trojně vazby, benzenový kruh). Pokud je v molekule několik konjugovaných vazeb, absorpce se posouvá do viditelné oblasti spektra. [21]

Odezva takového detektoru je citlivá a robustní pro většinu látek s chromoforem. Umožňuje kvalitativní určení látky i kvantitativní analýzu, jejíž vyhodnocení je založeno na Lambert-Beerově zákoně.

Pro UV oblast se obvykle jako zdroj záření používá deuteriová lampa. Zdrojem záření pro viditelnou oblast bývá wolframová lampa. Monochromatické záření potřebné vlnové délky se získává pomocí monochromátoru. Spektrometrické detektory jsou dostupné ve čtyřech základních konfiguracích.

#### Detektory s fixní vlnovou délkou

Jedná se o nejjednodušší konstrukční typ, který se v dnešní době téměř nepoužívá. Zdrojem záření je nízkotlaká rtuťová výbojka, která umožňuje detekci látek při vlnové délce 254 nm.

#### Detektory s měnitelnou vlnovou délkou

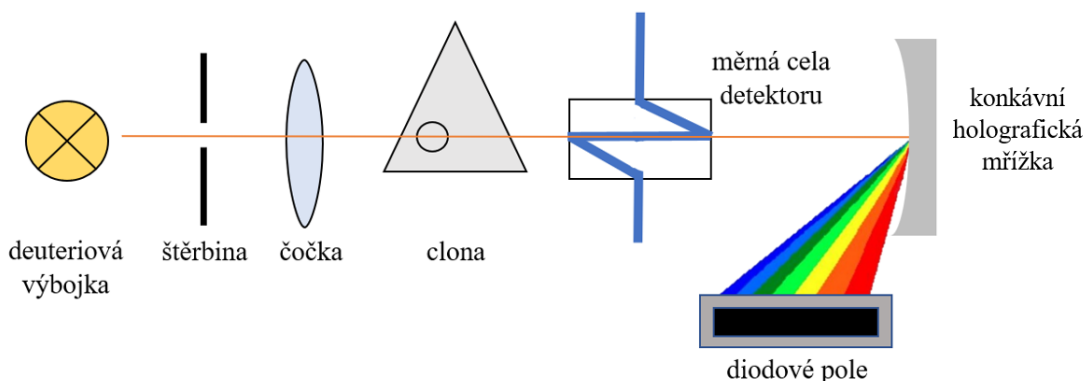
U těchto detektorů je možné přepínat pouze mezi vlnovými délkami, které jsou předem konstrukčně dané.

#### Detektory s programovatelnou vlnovou délkou

Vlnovou délku lze volitelně nastavovat v určitém rozmezí, nejčastěji od 190 do 700 nm, a tím dosáhnout maximální citlivosti. Navíc ji lze v průběhu analýzy měnit. Dostupné jsou i detektory, které umožňují měření při několika vlnových délkách současně. [22; 20; 43]

### Detektory s diodovým polem (DAD – diode-array detector)

Tento typ v průběhu analýzy snímá celé absorpční spektrum analytu (závislost absorpance na vlnové délce). Jeho schéma je znázorněno na obrázku 12. Záření je po průchodu měrnou celou spektrálně rozkládáno pomocí holografické mřížky a následně dopadá na diodové pole. To je tvořeno fotodiodami, kterých obvykle bývá 512-1024. Na každou z fotodiod dopadá záření o určité vlnové délce, zeslabené absorpcí v měrné cele detektoru.



*Obrázek 12 Schéma detektoru s diodovým polem*  
[vytvořeno podle zdroje 23]

Každá z fotodiod je spojena s kondenzátorem, který je předem nabitý. Po dopadu záření na diodu vzniká fotoelektrický proud, který kondenzátor vybije. Vybití je úměrné intenzitě dopadajícího záření. V další fázi jsou kondenzátory znovu nabity a měří se proud potřebný k nabití jednotlivých kondenzátorů. Informace o měření se ukládá do paměti řídicí jednotky. Sekvence vybíjení a nabíjení se opakuje v řádech milisekund. Postupně jsou tak při každé vlnové délce v každém okamžiku zaznamenávány údaje o absorbanci. Spektrální rozlišení určuje počet fotodiod umístěným na diodovém poli. Díky tomu tento detektor umožňuje vybrat vhodnou vlnovou délku pro detekci každého ze separovaných analytů a získat jejich UV spektrum.

K hlavním výhodám UV/VIS detektorů patří jejich snadná obsluha a nízká citlivost odezvy na změny teplot a složení mobilní fáze. Disponují poměrně vysokou citlivostí ( $10^{-9}$ - $10^{-10}$  g/ml) pro analyty obsahující ve své molekule chromofor. Jejich lineární dynamický rozsah činí až 5 řádů. [22; 20; 23; 42; 2; 41]



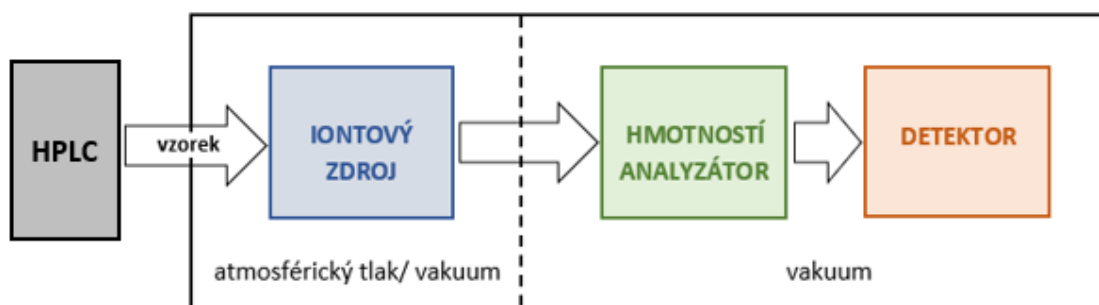
### 3.3.5.2. Fluorimetrické detektory (FD)

Pro detekci využívají princip fluorescence látek. Měří sekundární (emisní) záření, které látka vyzáří po absorpci primárního (excitačního) elektromagnetického záření. Zdrojem záření bývá obvykle xenonová výbojka. Tyto detektory lze tedy využít pro látky, které fluorescenci vykazují nebo které lze pomocí derivatizačního činidla převést na fluoreskující deriváty. Z toho je zřejmé, že jsou méně univerzální v porovnání s UV/VIS detektory. Oproti nim však vykazují vyšší citlivost ( $10^{-9}$ - $10^{-12}$  g/ml). [41; 20; 1]

### 3.3.5.3. Hmotnostně spektrometrické detektory (MS)

Hmotnostní spektrometrie je založena na ionizaci analyzované látky a na rozdělení výsledných iontů podle poměru  $m/z$  (hmotnosti/ náboje). Současným trendem je spojení kapalinové chromatografie s hmotností spektrometrií. Díky tomuto spojení lze provádět vysoce citlivé a selektivní kvalitativní i kvantitativní analýzy složitých směsí.

Zařízení pro MS detekci se skládá ze třech základních částí, které jsou znázorněny na obrázku 13. Existuje několik typů iontových zdrojů, hmotnostních analyzátorů a také tři základní typy detektorů, jejichž výčet již není předmětem této práce.



Obrázek 13 Základní schéma MS

[vytvořeno podle zdroje 22]

Proces detekce je mnohem komplikovanější než u ostatních typů detektorů. Nejprve dochází k ionizaci vzorku, při které jsou neutrální molekuly analytu převedeny na ionty. Poté ionty putují do analyzátoru, kde jsou rozděleny podle poměru  $m/z$  (hmotnosti/ náboje). Nakonec jsou detekovány a výsledkem je hmotnostní spektrum, tedy závislost relativní intenzity jednotlivých iontů na jejich  $m/z$ . Hmotnostní spektrometr tak kromě údajů z chromatogramu poskytuje navíc i spektrální údaje o identitě látky. Umožňuje tak strukturní analýzu využitelnou k identifikaci neznámých látek.

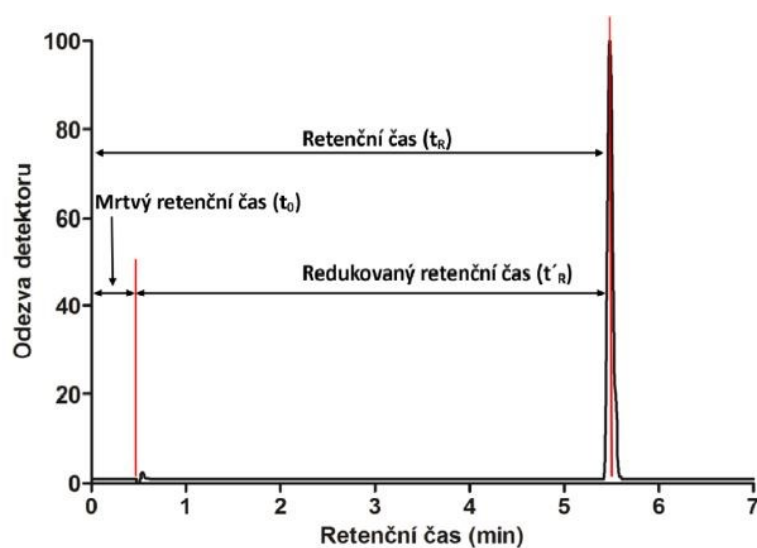
MS nachází hlavní využití v bioanalýze, potravinové analýze, proteomice, metabolomice a je využívána i při výzkumu či vývoji nových lékových struktur. [43; 22]

### 3.3.6. Základní charakteristiky HPLC separačního procesu

Výsledkem chromatografického procesu je chromatogram. Jedná se o časovou závislost intenzity signálu naměřené detektorem. Na chromatogramu jsou zobrazovány eluční křivky, tzv. píky, jejichž parametry jsou vyhodnocovány. Lze tak dosáhnout výsledků jak kvalitativní, tak i kvantitativní analýzy. Dále jsou popsány základní veličiny chromatografického systému. [3; 19]

#### Retenční čas ( $t_R$ )

Vyjadřuje čas (min), který uplyne od nástřiku vzorku do systému po dosažení vrcholu chromatografického píku. Jedná se o základní veličinu kvalitativní analýzy a popisuje chování analytu v systému HPLC. Retenční čas látky, která na koloně není zadržována vůbec a je volně unášena proudem mobilní fáze se nazývá mrtvý retenční čas ( $t_0$ ). Doba interakce analytu se stacionární fází je vyjádřena pomocí redukovaného retenčního času ( $t'_R$ ). Ten lze vypočítat odečtením  $t_0$  od  $t_R$ .



Obrázek 14 Retenční čas, mrtvý retenční čas a redukovaný retenční čas  
[převzato ze zdroje 19]

#### Kapacitní faktor ( $k'$ )

Někdy bývá označován jako retenční faktor. Jedná se o bezrozměrnou veličinu, která objektivně popisuje retenční chování analytu nezávisle na rozměrech kolony a průtoku mobilní fáze. Lze jej vypočítat podle vzorce:

$$k' = \frac{(t_R - t_0)}{t_0}$$

### Selektivita ( $\alpha$ )

Vyjadřuje schopnost chromatografického systému rozlišit dva různé analyty. Jedná se o poměr kapacitních faktorů dvou různých analytů:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

### Účinnost – počet teoretických pater ( $N$ )

Účinnost chromatografického systému je nejčastěji vyjadřována pomocí počtu teoretických pater. Předpokládá se výskyt opakovaně se ustavující rovnováhy mezi množstvím analytu v mobilní a stacionární fázi. V určitém okamžiku ustavení rovnováhy existuje určitý počet teoretických pater. Čím je  $N$  vyšší, tím méně je zóna analytu při průchodu kolonou rozmývána a tím vyšší je účinnost systému. Výpočet počtu teoretických pater vyjadřuje rovnice:

$$N = 5,545 \times \left( \frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

$t_R$  – retenční čas;  $w_h$  – šířka píku v polovině jeho výšky vyjádřená časem

Každé teoretické patro má definovanou výšku. Ta je vyjadřována jako výškový ekvivalent teoretického patra ( $H$ ) neboli HETP (*the height equivalent to a theoretical plate*). Tento parametr se využívá pro porovnání účinnosti kolon s rozdílnou délkou a vypočítává se dle následujícího vzorce:

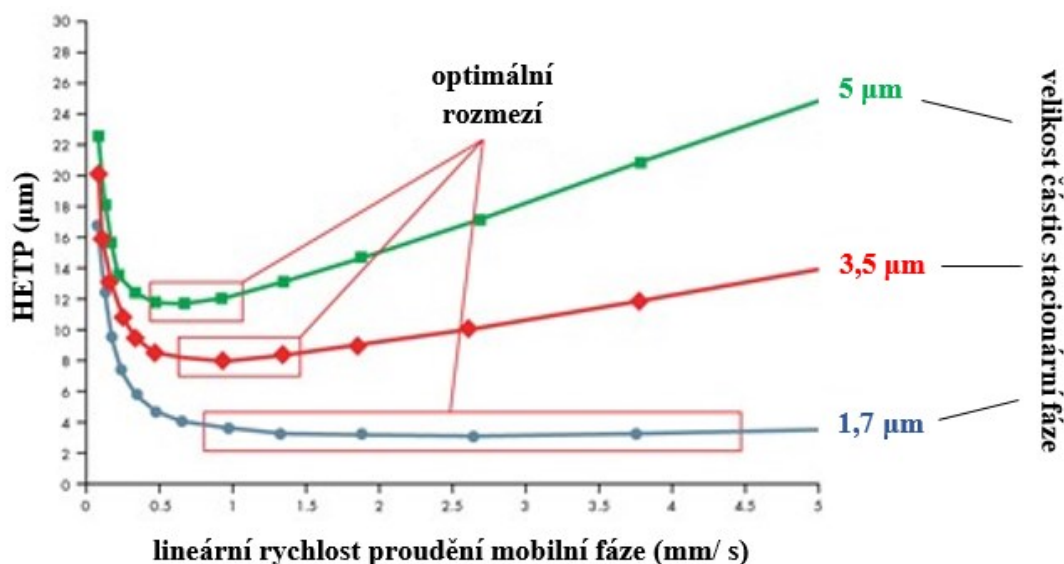
$$H = \frac{L}{N}$$

$L$  – délka kolony;  $N$  – účinnost kolony (počet teoretických pater)

Účinnost chromatografického systému určuje především kvalita sorbentu, velikost částic, průtok mobilní fáze a celkově technické parametry instrumentu.

Závislost účinnosti separace na velikosti částic stacionární fáze a rychlosti průtoku mobilní fáze vyjadřuje Van Deemterova křivka (viz obrázek 15). Účinnost roste se snižující se velikostí částic sorbentu. Minimum křivky udává průtokové rychlosti, při nichž kolona vykazuje nejvyšší účinnost (na obrázku označeno jako optimální rozmezí).

[19; 3; 20; 44]



Obrázek 15 Van Deemterova křivka vyjadřující účinnost separace v závislosti na velikosti částic a rychlosti průtoku mobilní fáze [převzato a upraveno ze zdroje 44]

### Rozlišení ( $R$ )

Vyjadřuje míru separace dvou chromatografických píků. Na rozdíl od selektivity však bere v potaz i účinnost vyjádřenou pomocí šířky píky. Pro dosažení separace dvou píků na základní linii je obvykle potřeba dosáhnout hodnoty rozlišení alespoň 1,5. Lze jej vypočítat z rovnice:

$$R = 1,18 \times \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{w_{h_2} + w_{h_1}}$$

$t_{R_1}$ ,  $t_{R_2}$  – retenční časy píků;  $w_{h_1}$ ,  $w_{h_2}$  – šířky píků v polovině jejich výšky

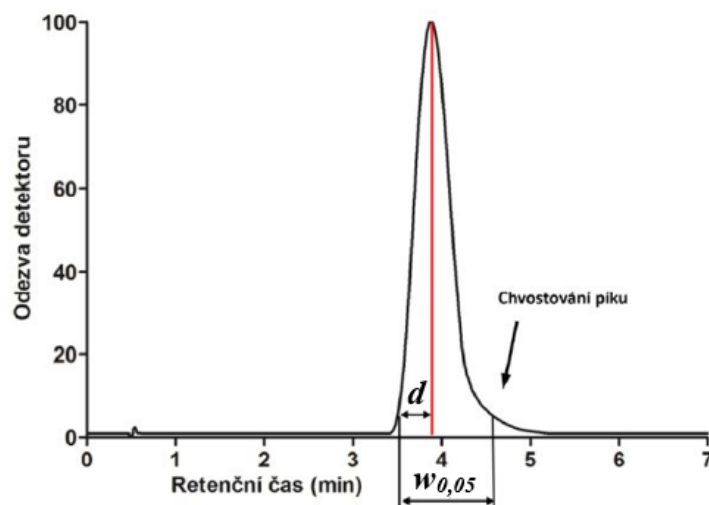
### Faktor symetrie ( $A_s$ )

V ideálním případě by měl být pík symetrický a  $A_s$  by tak dosahoval hodnoty 1,0. Tento faktor se tedy používá pro určení pravidelnosti tvaru píku a vypočítá se podle vzorce:

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

$w_{0,05}$  – šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky;  $d$  – vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z maxima píku a čelem píku v jedné dvacetině jeho výšky

[20; 3; 19; 21]



*Obrázek 16 Faktor symetrie píku*  
[převzato a upraveno ze zdroje 19]

## 4. Experimentální část

### 4.1. Přístroje, chemikálie a pomůcky

#### 4.1.1. Chromatografický systém

**čerpadlo:** LC-20AD VP Shimadzu

**degasser:** DGU-20A3 VP Shimadzu

**autosampler:** SIL-20AC VP Shimadzu

**chromatografická kolona:** Hypercarb<sup>TM</sup>; 100×3 mm; 3 μm; Thermo Fisher Scientific Inc.

**termostat kolony:** CTO-20AS VP Shimadzu

**UV-VIS detektor:** SPD-20A VP Shimadzu

**řídící jednotka:** CBM-20A VP Shimadzu

**kontrolní jednotka:** CTO-20AC VP Shimadzu

**PC program:** LabSolutions 5.92 Shimadzu

#### 4.1.2. Přístroje

**digitální analytické váhy:** Sartorius AG A200S, Německo

**pH-metr:** SCHOTT CG 843, Schott Instruments GmbH, Německo

**magnetické míchadlo:** IKA Color Squid, Německo

#### 4.1.3. Chemikálie

**aciklovir (ACI),** Pliva Lachema, Česká republika

**guanin hydrochlorid (GUA),** Pliva Lachema, Česká republika

**acetonitril (ACN),** for HPLC, gradient grade, Sigma Aldrich, Německo

**methanol (MeOH),** for HPLC, gradient grade, Sigma Aldrich, Německo

**propan-2-ol (ISOP) (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHOH,** gradient HPLC grade, Scharlau, EU

**tetrahydrofuran (THF),** HPLC grade, without stabilizer, Scharlau, EU

**kyselina octová CH<sub>3</sub>COOH,** Penta, Česká republika

**kyselina trifluorooctová (TFA),** Penta Česká republika

**diethylamin (DEA),** Sigma Aldrich, Německo

**dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O,** Penta, Česká republika

**hydrogenfosforečnan sodný dihydrát Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O,** Penta, Česká republika

**dihydrogenfosforečnan draselný KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,** Penta, Česká republika

**fluorid amonný NH<sub>4</sub>F,** Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika

**ethanol** (EtOH), Dr. Kulich Pharma, Česká republika

**hydroxid sodný** NaOH, Dr. Kulich Pharma, Česká republika

**voda čištěná reverzní osmózou**, Merck Millipore

#### 4.1.4. Pomůcky

mikropipety, vialky, laboratorní lžičky, navažovací lodičky, skleněné tyčinky, odměrné baňky, odměrné válce, kádinky, odsávací baňka, nylonový membránový filtr (Whatman 0,45  $\mu\text{m}$ ), magnetické míchadlo, zásobníky mobilní fáze, alobal

## 4.2. Obecné postupy

### 4.2.1. Příprava vzorků pro analýzu

Zásobní roztok acikloviru byl připraven smísením 5 mg ACI s 0,5 ml THF a následným doplněním do 5,0ml odměrné baňky směsí acetonitril/voda v poměru 50 : 50 (v/v). Z tohoto roztoku bylo odebráno 0,5 ml do 10,0ml odměrné baňky a doplněno směsí acetonitril/voda v poměru 50 : 50 (v/v). Výsledná koncentrace roztoku acikloviru byla 50 µg/ml. Před měřením bylo 0,05 ml tohoto roztoku pipetováno do vialky a doplněno do objemu 1,0 ml směsí acetonitril/voda v poměru 50 : 50 (v/v). Výsledná koncentrace ACI ve vzorku byla 2,5 µg/ml.

Příprava roztoku guaninu probíhala obdobným způsobem s tím rozdílem, že v prvním kroku byl přidán 1,0 ml 1M NaOH, aby se usnadnilo rozpuštění guaninu. Výsledná koncentrace GUA ve vzorku činila 2,5 µg/ml.

Směsný vzorek byl připravován přímo do vialky. Z každého roztoku o koncentraci 50 µg/ml bylo do jedné vialky odebráno 0,2 ml a doplněno do 1,0 ml směsí acetonitril/voda v poměru 50 : 50 (v/v). Výsledná koncentrace ACI i GUA ve směsném vzorku byla 10 µg/ml.

Všechny roztoky a vzorky byly uchovávány v lednici při teplotě 2-8°C.

### 4.2.2. Příprava roztoků

Byly připraveny roztoky kyseliny octové o koncentracích 0,05 %; 0,1 % a 0,2 %. Vypočítaný objem kyseliny octové ( $M_{\text{CH}_3\text{COOH}} = 60,0516 \text{ g/mol}$ ;  $\rho = 1,055 \text{ g/cm}^3$ ) byl odměřen mikropipetou do odměrné baňky, která byla čištěnou vodou doplněna po rysku na daný objem.

Obdobným způsobem byl připraven 0,1% roztok kyseliny trifluoroctové ( $M_{\text{CF}_3\text{COOH}} = 114,030 \text{ g/mol}$ ;  $\rho = 1,5351 \text{ g/cm}^3$ ).

Roztok diethylaminu ( $M_{\text{DEA}} = 73,137 \text{ g/mol}$ ;  $\rho = 0,708 \text{ g/cm}^3$ ) byl připraven tak, aby celková koncentrace diethylaminu v jednotlivých mobilních fázích byla 0,1 %.



Dále byly připraveny roztoky s fluoridem amonným ( $M_{\text{NH}_4\text{F}} = 37,037 \text{ g/mol}$ ). Vypočítané a navážené množství bylo rozpuštěno v čištěné vodě. Mobilní fáze byly připraveny tak, aby celková koncentrace fluoridu amonného v mobilních fázích odpovídala 0,5 mM; 1 mM; 2,5 mM; 5 mM; 10 mM.

Připraven byl také tlumivý roztok fosforečnanový o pH 7,0 (2) dle ČL 2017 [3]. Jeho výsledná koncentrace v mobilní fázi byla 5 mM. (dihydrogenfosforečnan draselný ( $M_{\text{KH}_2\text{PO}_4} = 136,086 \text{ g/mol}$ ))

Posledním byl roztok připravený kombinací hydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu ( $M_{\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} = 177,99 \text{ g/mol}$ ) a dihydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu ( $M_{\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}} = 156,010 \text{ g/mol}$ ) ve vzájemném poměru 390 : 610 na 1000 ml. Výsledná koncentrace fosforečnanů v mobilní fázi byla 2,5 mM. [46]

#### 4.2.3. Příprava mobilních fází

Mobilní fáze vždy obsahovaly organickou a vodnou složku v určitém poměru. Pro přípravu mobilních fází byla použita následující rozpouštědla: acetonitril (ACN), methanol (MeOH) a propan-2-ol (ISOP). Ta tvořila organickou fázi buď samostatně nebo ve vzájemných kombinacích s různými poměry. Vodnou fázi tvořila čištěná voda s přidávkem vhodné pufrovací látky o určité koncentraci (kyselina octová, kyselina trifluoroctová, diethylamin, fluorid amonný, fosforečnany). Konkrétní poměry a koncentrace jednotlivých složek budou popsány v příslušných částech kapitoly 5.

Před každou analýzou byla připravená mobilní fáze zfiltrována přes nylonový membránový filtr Whatman 0,45  $\mu\text{m}$ , aby se odstranily mechanické nečistoty.

### 4.3. Optimalizace podmínek HPLC separace

#### 4.3.1. Chromatografické podmínky

Pro HPLC analýzu byly nastaveny následující podmínky:

**kolona:** Hypercarb<sup>TM</sup>; 100×3 mm; 3,5 μm; Thermo Fisher Scientific Inc.

**průtok:** 0,7 ml/min

**detekce:** UV 254 nm

**teplota kolony:** 50 °C

**množství nastříkovaného vzorku:** 10 μl

**mobilní fáze:** směs organické a vodné složky v různých poměrech s přídavkem pufru

Teplota 50 °C a průtok 0,7 ml/min byly zvoleny jako optimální na základě zkušeností z předchozích diplomových prací [1; 2] a zkušeností katedry. Obecně lze konstatovat, že při nižších teplotách a nižším průtoku dochází k většímu rozmytí píků, naopak při vyšší teplotě a vyšším průtoku se eluční zóna zkracuje.

#### 4.3.2. Přednastavení chromatografického systému

Před každým měřením nebo při výměně mobilní fáze byl chromatografický systém propláchnut danou mobilní fází pomocí funkce „purge“. Poté se mobilní fáze nechala protékat kolonou alespoň 30 minut při stanoveném průtoku a teplotě, aby došlo k ustálení základní linie. Po ukončení měření byl systém propláchnut 50% roztokem ACN při teplotě 50 °C. Po použití TFA jako pufru v mobilní fázi byl k proplachu použit 50% THF při teplotě 70 °C, jak uvádí příručka výrobce [36]. Každý z analyzovaných vzorků (roztok ACI, roztok GUA a směsný roztok) byl pro každou testovanou mobilní fází nastříkován dvakrát z jedné vialky.

## 5. Výsledky a diskuse

Bylo testováno retenční chování ACI a GUA v závislosti na různém složení, respektive poměrech složek mobilních fází.

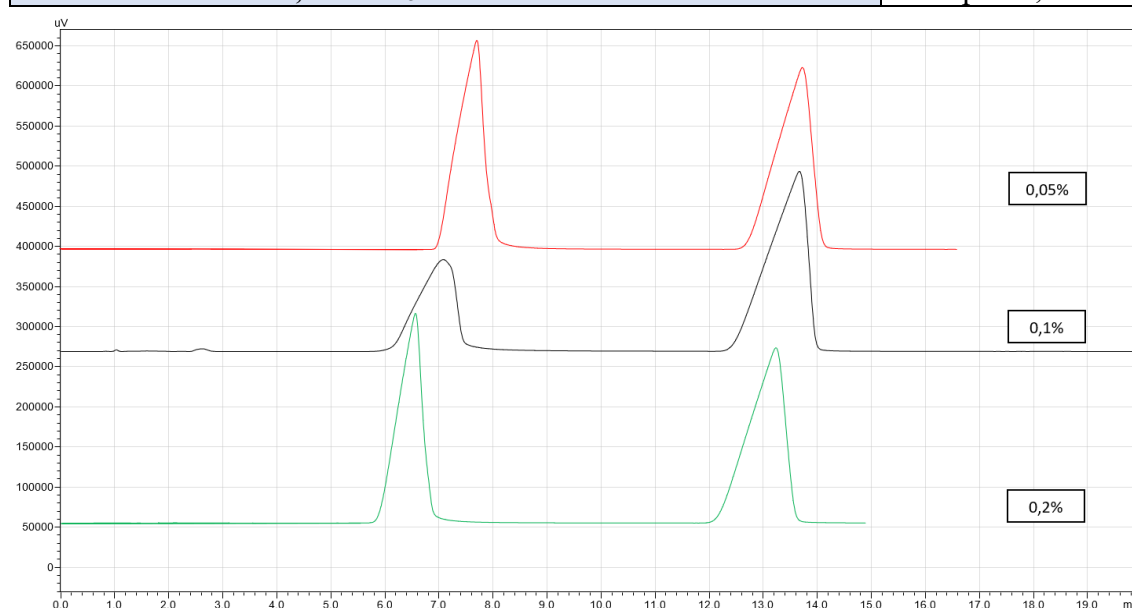
Na kolonách Hypercarb<sup>TM</sup> je retence ovlivňována mnoha faktory, mezi něž patří polarita a planarita molekul. Na retenci mají vliv také disperzní síly mezi analytem a povrchem grafitu. Dále je ovlivněna interakcemi polarizovatelných nebo polárních funkčních skupin analytu s polarizovatelným povrchem grafitu zahrnujícím delokalizované  $\pi$ -elektrony. Dva posledně jmenované faktory navíc působí protichůdně. Mechanismy retence jsou podrobněji popsány v kapitole 3.3.4.3., avšak dosud nebyly dostatečně objasněny.

## 5.1. Vliv změny poměru vodné a organické složky mobilní fáze s obsahem kyseliny octové nebo kyseliny trifluoroctové jako pufrů

### 5.1.1. Mobilní fáze s obsahem kyseliny octové

Nejprve byl zkoumán vliv různé koncentrace kyseliny octové na retenci ACI a GUA. Jako organická složka byl použit čistý ACN. Mobilní fáze obsahovaly 0,05 %; 0,1 % a 0,2 % kyselinu octovou v celkovém objemu. Poměr vodné a organické složky činil 85 : 15.

<b>0,05% CH<sub>3</sub>COOH : ACN</b>	pH: 3,4
<b>0,1% CH<sub>3</sub>COOH : ACN</b>	pH: 3,3
<b>0,2% CH<sub>3</sub>COOH : ACN</b>	pH: 3,1



Obrázek 17 Vliv koncentrace kyseliny octové na retenci. první pík GUA, druhý pík ACI

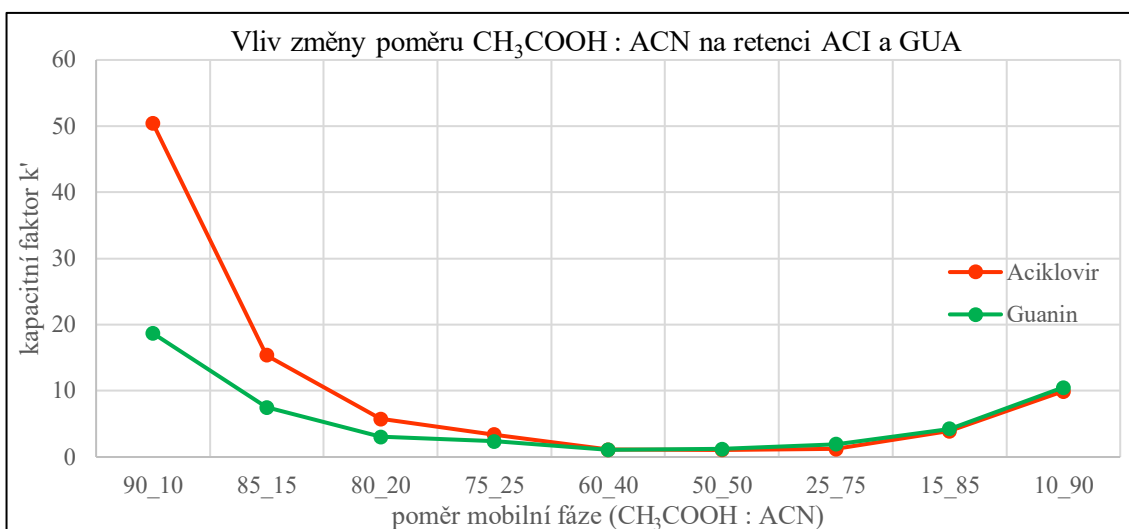
Z chromatogramu (obrázek 17) vyplývá, že změna koncentrace kyseliny octové v použitém rozsahu měla zanedbatelný vliv na retenci. Proto byla při dalších měřeních použita prostřední hodnota koncentrace 0,1 %.

Dále byl testován vliv změny poměru vodné a organické složky mobilní fáze na retenci acikloviru a guaninu za použití 0,1% kyseliny octové jako pufru. Jednotlivé kombinace složek mobilních fází jsou popsány v tabulkách následujících podkapitol.

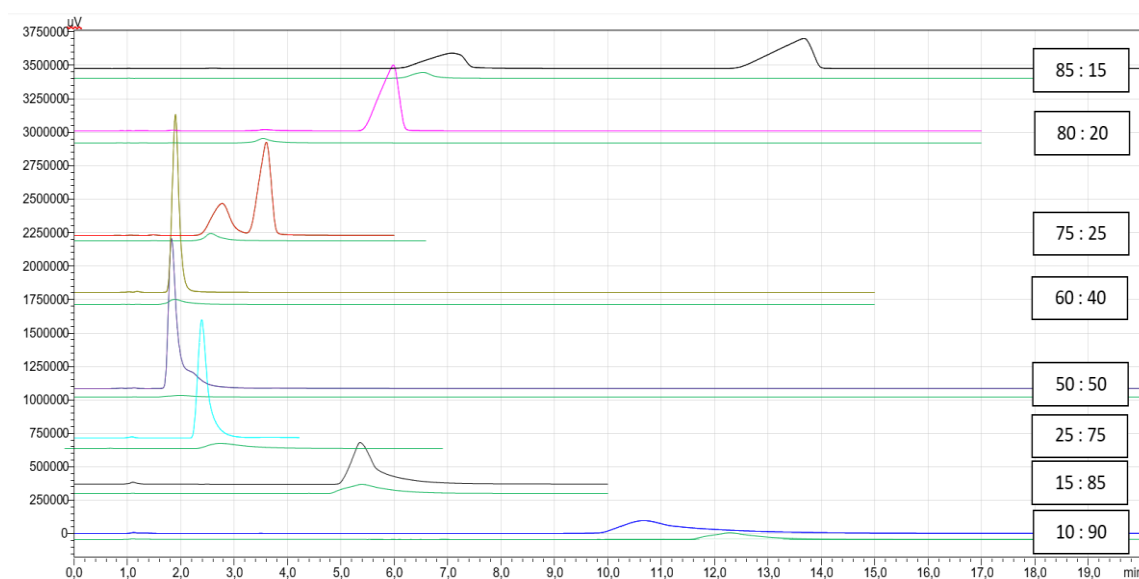
5.1.1.1. CH<sub>3</sub>COOH : ACN

0,1% CH <sub>3</sub> COOH : ACN							
	pH MF	t <sub>M</sub>	t <sub>R</sub> ACI	t <sub>R</sub> GUA	k' ACI	k' GUA	rozlišení
<b>90 : 10</b>	3,3	0,87	44,81	17,17	50,39	18,69	9,66
<b>85 : 15</b>	3,3	0,83	13,67	7,08	15,39	7,49	2,74
<b>80 : 20</b>	3,4	0,88	5,98	3,57	5,77	3,04	3,83
<b>75 : 25</b>	3,4	0,82	3,60	2,77	3,37	2,36	1,48
<b>60 : 40</b>	3,6	0,90	1,90	1,88	1,10	1,08	-
<b>50 : 50</b>	3,7	0,88	1,82	1,97	1,06	1,23	-
<b>25 : 75</b>	3,9	1,06	2,35	3,14	1,22	1,95	-
<b>15 : 85</b>	4,0	1,09	5,37	5,74	3,93	4,27	-
<b>10 : 90</b>	4,0	1,09	11,86	12,49	9,91	10,49	-

Tabulka 4 Složení MF s obsahem 0,1% CH<sub>3</sub>COOH : ACN, pH MF a retenční charakteristiky analytů (zvýrazněn poměr, při kterém došlo ke změně pořadí eluce)



Graf 1 Vliv změny poměru CH<sub>3</sub>COOH : ACN na retenci ACI a GUA



Obrázek 18 Retenční chování směsného vzorku při změnách poměru CH<sub>3</sub>COOH : ACN. zelená – samotný GUA pro porovnání

Na chromatogramu (obrázek 18) je znázorněn přehled retenčního chování analytů v závislosti na změnách poměru mezi vodnou složkou s 0,1% kyselinou octovou a ACN. Poměr 90 : 10 zde uveden není z důvodu dlouhých retenčních časů (ACI: 44,81 min; GUA: 17,17 min). Při poměrech s vyšším obsahem vodné složky se GUA eluoval jako první. U poměru 60 : 40 došlo k překrytí obou píků. S dalším snižováním poměru vodné složky se retenční čas obou analytů prodlužoval, přičemž se jako první eluoval ACI.

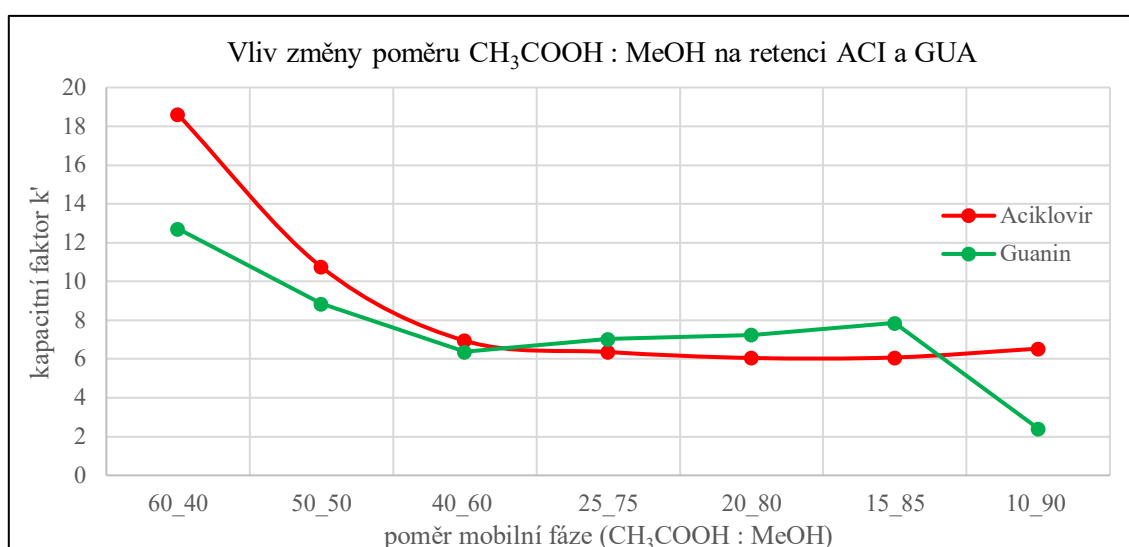
Předchozí studie se zabývaly retencí různých sloučenin v závislosti na koncentraci ACN v mobilní fázi na kolonách Zr-PBD, b-ZrO<sub>2</sub> a Zr-C. Bylo prokázáno, že závislost retence na koncentraci se projevuje typickou křivkou tvaru písmene „U“. [1; 2; 34; 37]. Tento jev se projevil i při použití kolony Hypercarb<sup>TM</sup>, a to nejen v případě ACN, ale také při jiných složkách organické fáze, jak je patrné z grafů dalších kapitol.

V případě nižšího podílu vodné složky retence analytů s dalším snižováním polarity mobilní fáze stoupala. Mohlo by se jednat o efekt polárního zadržování na grafitu (PREG), který byl popsán v kapitole 3.3.4.3. U mobilních fází s vyšším poměrem vodné složky byl však jev opačný, což poukazuje na fakt, že se na retenci podílí více faktorů zároveň.

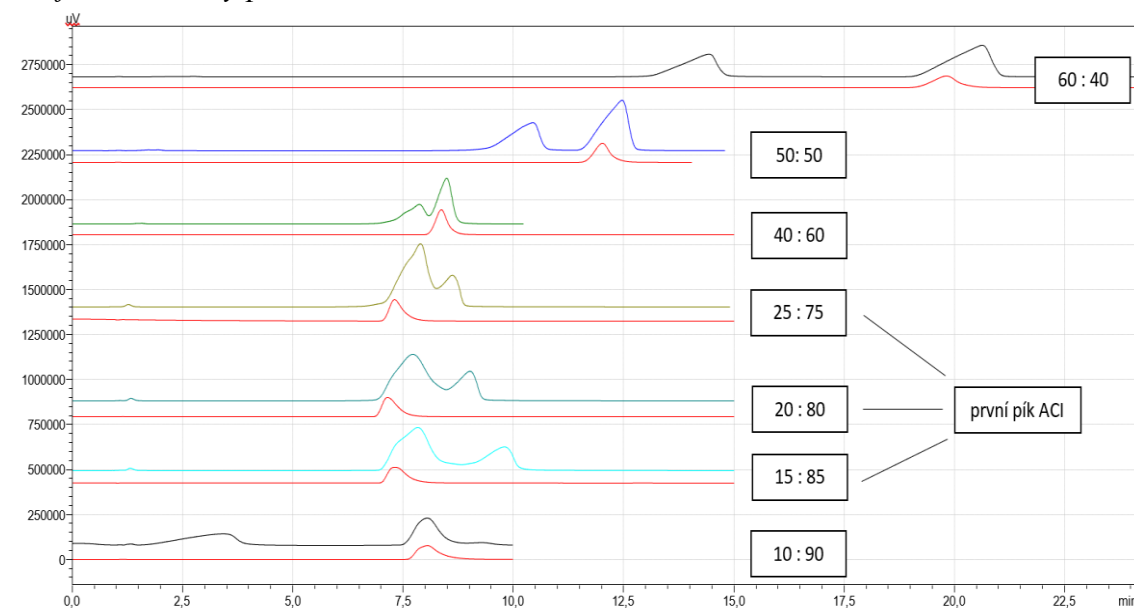
5.1.1.2. CH<sub>3</sub>COOH : MeOH

0,1% CH <sub>3</sub> COOH : MeOH							
	pH MF	t <sub>M</sub>	t <sub>R</sub> ACI	t <sub>R</sub> GUA	k' ACI	k' GUA	rozlišení
<b>60 : 40</b>	3,7	1,05	20,64	14,44	18,60	12,71	3,45
<b>50 : 50</b>	3,8	1,06	12,47	10,45	10,74	8,84	1,66
<b>40 : 60</b>	4,0	1,07	8,49	7,87	6,94	6,36	0,15
<b>25 : 75</b>	4,3	1,09	7,98	8,71	6,36	7,02	0,71
<b>20 : 80</b>	4,3	1,09	7,72	9,01	6,05	7,24	1,03
<b>15 : 85</b>	4,4	1,11	7,83	9,79	6,08	7,85	1,55
<b>10 : 90</b>	4,5	1,08	8,13	3,68	6,53	2,40	2,18

Tabulka 5 Složení MF s obsahem 0,1% CH<sub>3</sub>COOH : MeOH, pH MF a retenční charakteristiky analytů (zvýrazněny poměry, při kterých došlo k výměně pořadí píků )



Graf 2 Vliv změny poměru CH<sub>3</sub>COOH : MeOH na retenci ACI a GUA



Obrázek 19 Retenční chování směšného vzorku při změnách poměru CH<sub>3</sub>COOH : MeOH. červená – samotný ACI pro porovnání

Při výměně ACN za MeOH došlo k výraznému prodloužení  $t_R$  obou analytů, a proto se retenční chování testovalo až od poměru 60 : 40. Nejprve se jako první eluoval GUA, při poměru 25 : 75 došlo ke změně pořadí eluce. Jediným poměrem, při kterém byly  $t_R$  kratší, než při použití ACN, byl poměr 10 : 90. Zároveň došlo k opětovné změně pořadí a GUA se eluoval jako první. Tato neočekávaná změna byla ověřena opakovaným měřením, aby se zjistilo, zda nejde o náhodnou chybu.

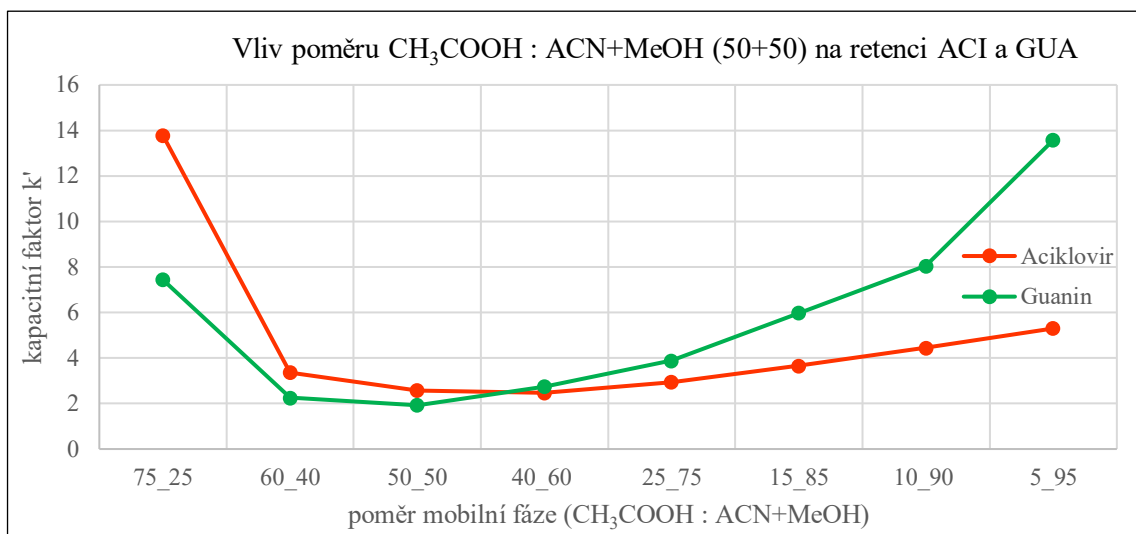


### 5.1.1.3. CH<sub>3</sub>COOH : ACN+MeOH

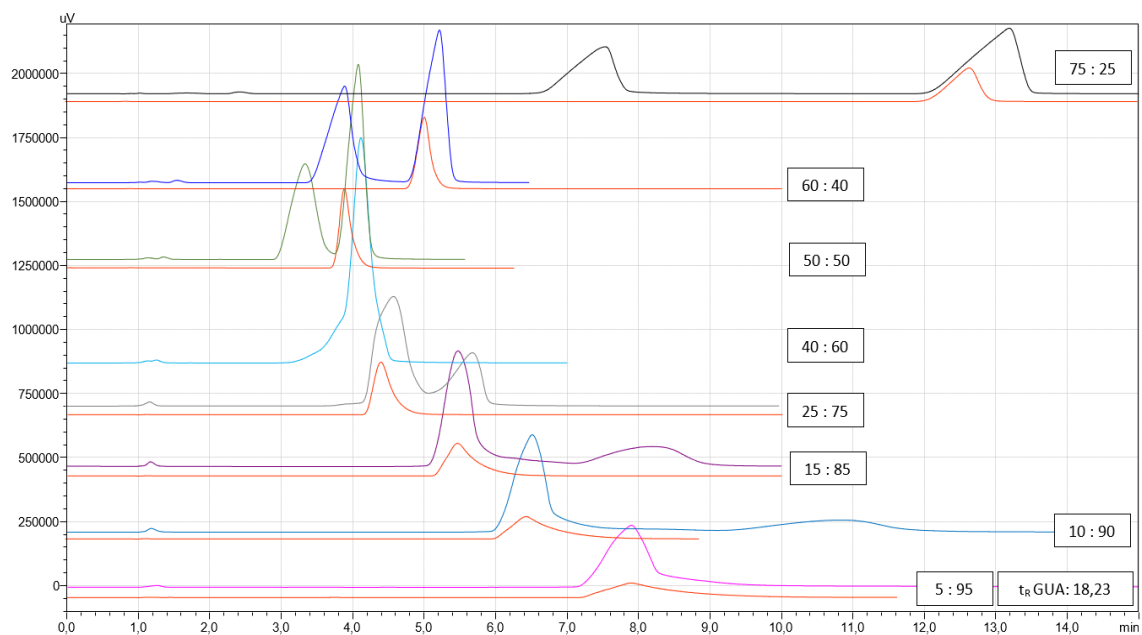
Následně byla pro organickou fází použita kombinace ACN+MeOH (50+50). Předpokládalo se, že  $t_R$  se budou pohybovat mezi hodnotami, které byly naměřeny v případě předchozího použití samotného ACN a samotného MeOH vzhledem k jejich rozdílné polaritě.

0,1% CH <sub>3</sub> COOH : ACN+MeOH (50+50)							
	pH MF	$t_M$	$t_R$ ACI	$t_R$ GUA	$k'$ ACI	$k'$ GUA	rozlišení
75 : 25	3,4	0,89	13,18	7,53	13,78	7,44	4,52
60 : 40	3,6	1,20	5,21	3,89	3,36	2,25	2,22
50 : 50	3,8	1,14	4,08	3,33	2,58	1,92	1,38
40 : 60	4,0	1,13	3,93	4,23	2,47	2,74	-
25 : 75	4,3	1,17	4,60	5,70	2,94	3,89	1,46
15 : 85	4,6	1,17	5,47	8,19	3,66	5,98	2,21
10 : 90	4,8	1,20	6,51	10,83	4,44	8,05	2,49
5 : 95	5,0	1,25	7,9	18,23	5,31	13,57	3,66

Tabulka 6 Složení MF s obsahem 0,1% CH<sub>3</sub>COOH : ACN+MeOH (50+50), pH MF a retenční charakteristiky analytů (zvýrazněn poměr, při kterém došlo ke změně pořadí eluce)



Graf 3 Vliv změny poměru CH<sub>3</sub>COOH : ACN+MeOH na retenci ACI a GUA



Obrázek 20 Retenční chování směšného vzorku při změnách poměru  $\text{CH}_3\text{COOH} : \text{ACN} + \text{MeOH}$ . červená – samotný *ACI* pro porovnání

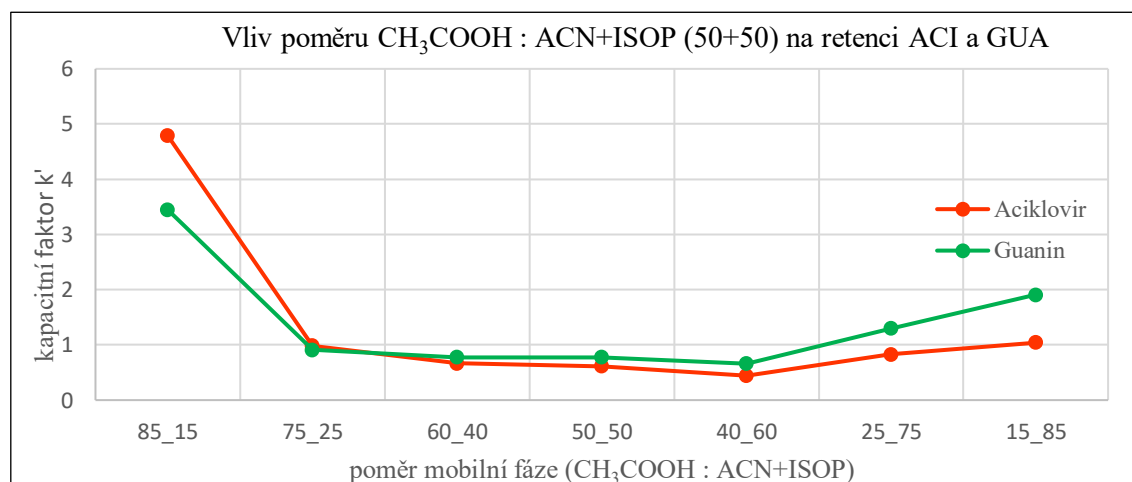
Dle předpokladu se retenční časy prodloužily oproti použití samotného ACN a zároveň byly kratší než při použití samotného MeOH. S rostoucím obsahem organické složky se zhoršily tvary píků, a to především GUA, u kterých docházelo ke značnému rozmývání.

#### 5.1.1.4. CH<sub>3</sub>COOH : ACN+ISOP

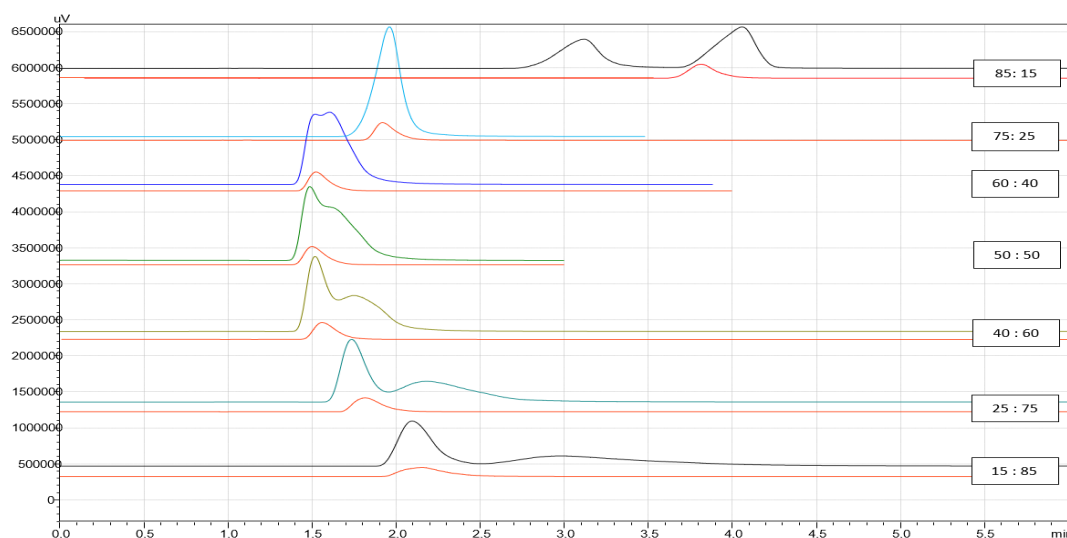
Jako další složka organické fáze byl do kombinace zvolen propan-2-ol. Jeho polarita se nachází mezi hodnotami ACN a MeOH. Bylo tedy předpokládáno, že nedojde k tak velkému prodloužení  $t_R$  jako v případě použití MeOH.

0,1% CH <sub>3</sub> COOH : ACN+ISOP (50+50)							
	pH MF	$t_M$	$t_R$ ACI	$t_R$ GUA	$k'$ ACI	$k'$ GUA	rozlišení
85 : 15	3,3	0,70	4,06	3,12	4,79	3,45	1,97
75 : 25	3,4	0,97	1,92	1,85	0,98	0,91	-
60 : 40	3,5	0,92	1,52	1,63	0,66	0,78	0,02
50 : 50	3,8	0,93	1,50	1,65	0,61	0,78	-
40 : 60	4,0	1,05	1,52	1,75	0,44	0,66	0,34
25 : 75	4,3	0,95	1,74	2,18	0,83	1,30	0,76
15 : 85	4,5	1,03	2,10	2,98	1,04	1,91	0,95

Tabulka 7 Složení MF s obsahem 0,1% CH<sub>3</sub>COOH : ACN+ISOP (50+50), pH MF a retenční charakteristiky analytů (zvýrazněn poměr, kde došlo ke změně pořadí eluce)



Graf 4 Vliv změny poměru CH<sub>3</sub>COOH : ACN+ISOP na retenci ACI a GUA



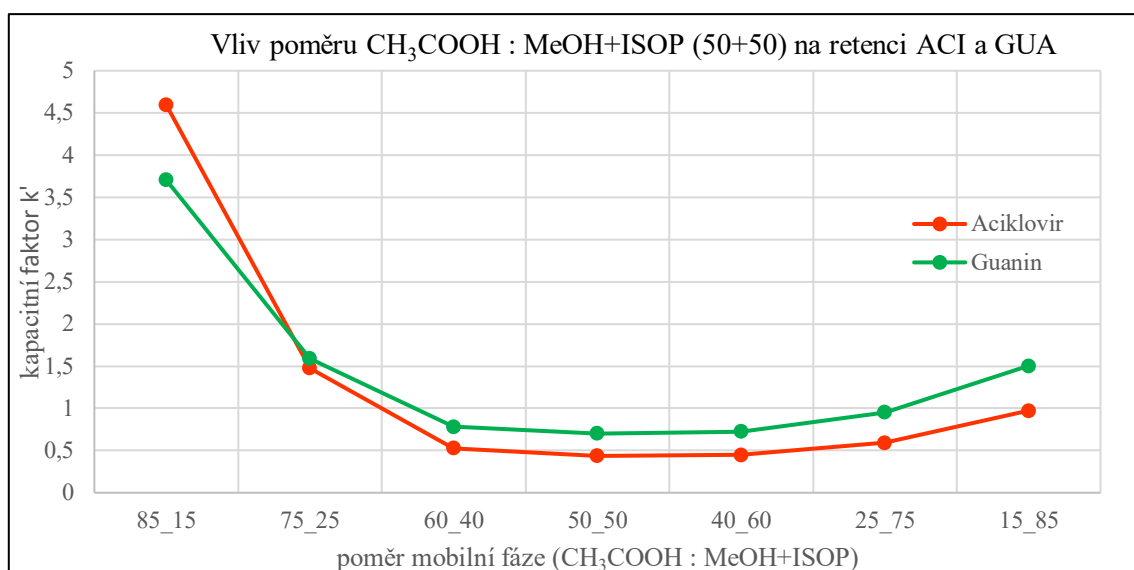
Obrázek 21 Retenční chování směšného vzorku při změnách poměru CH<sub>3</sub>COOH : ACN+ISOP. červená – samotný ACI pro porovnání

Použití ISOP výrazně zkrátilo  $t_R$  obou analytů. Obdobně jako v předchozím případě s ACN+MeOH docházelo k výraznějšímu rozmývání píků, a to hlavně GUA. Separace byla u všech zvolených poměrů nevyhovující s výjimkou poměru 85 : 15 s hodnotou rozlišení 1,97.

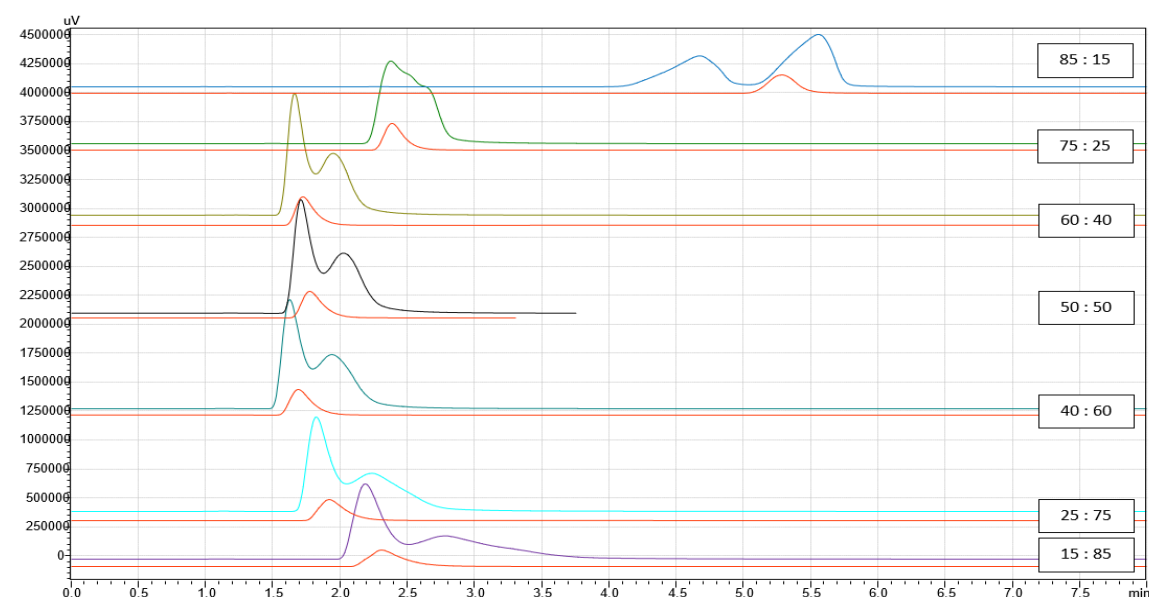
5.1.1.5. CH<sub>3</sub>COOH : MeOH+ISOP

0,1% CH <sub>3</sub> COOH : MeOH+ISOP (50+50)							
	pH MF	t <sub>M</sub>	t <sub>R</sub> ACI	t <sub>R</sub> GUA	k' ACI	k' GUA	rozlišení
85 : 15	3,3	0,99	5,56	4,67	4,60	3,71	1,30
75 : 25	3,4	0,97	2,39	2,50	1,48	1,59	-
60 : 40	3,6	1,09	1,66	1,93	0,53	0,78	0,68
50 : 50	3,8	1,19	1,71	2,02	0,44	0,70	0,72
40 : 60	4,1	1,12	1,62	1,93	0,45	0,72	0,60
25 : 75	4,5	1,15	1,83	2,24	0,59	0,95	0,59
15 : 85	4,9	1,12	2,20	2,80	0,97	1,50	0,67

Tabulka 8 Složení MF s obsahem 0,1% CH<sub>3</sub>COOH : MeOH+ISOP (50+50), pH MF a retenční charakteristiky analytů (zvýrazněn poměr, při kterém došlo k výměně pořadí piků)



Graf 5 Vliv změny poměru CH<sub>3</sub>COOH : MeOH+ISOP na retenci ACI a GUA

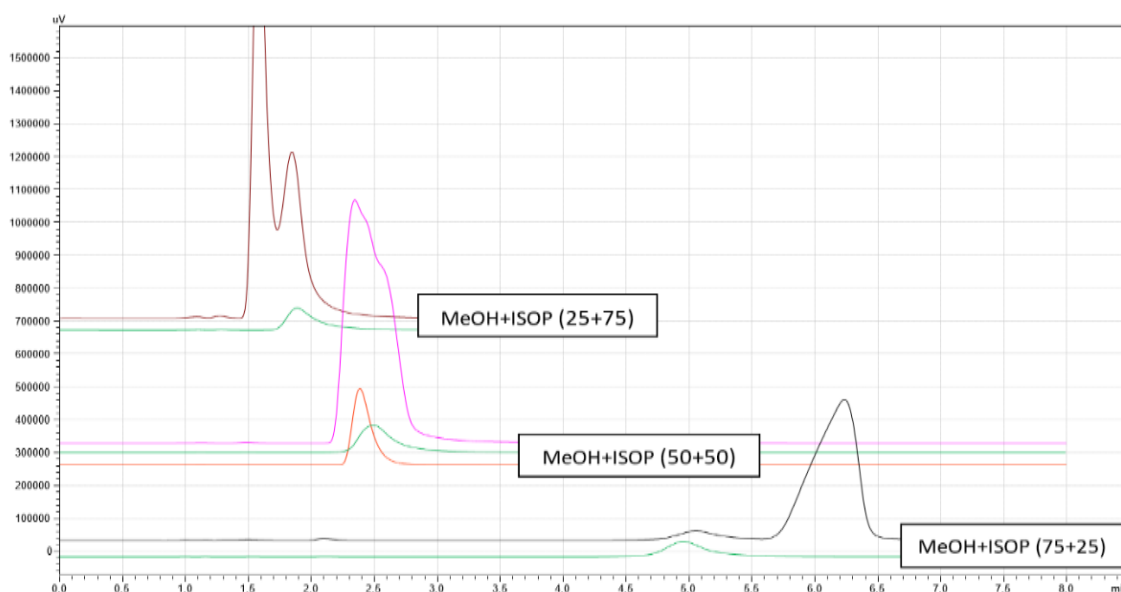


Obrázek 22 Retenční chování směšného vzorku při změnách poměru CH<sub>3</sub>COOH : MeOH+ISOP. červená – samotný ACI pro porovnání

Retenční časy i tvary píků byly velmi podobné jako v případě použití ACN s ISOP. Jejich rozlišení bylo ve všech případech pod hodnotou 1,5, což neodpovídá obecným požadavkům pro dostatečnou separaci.

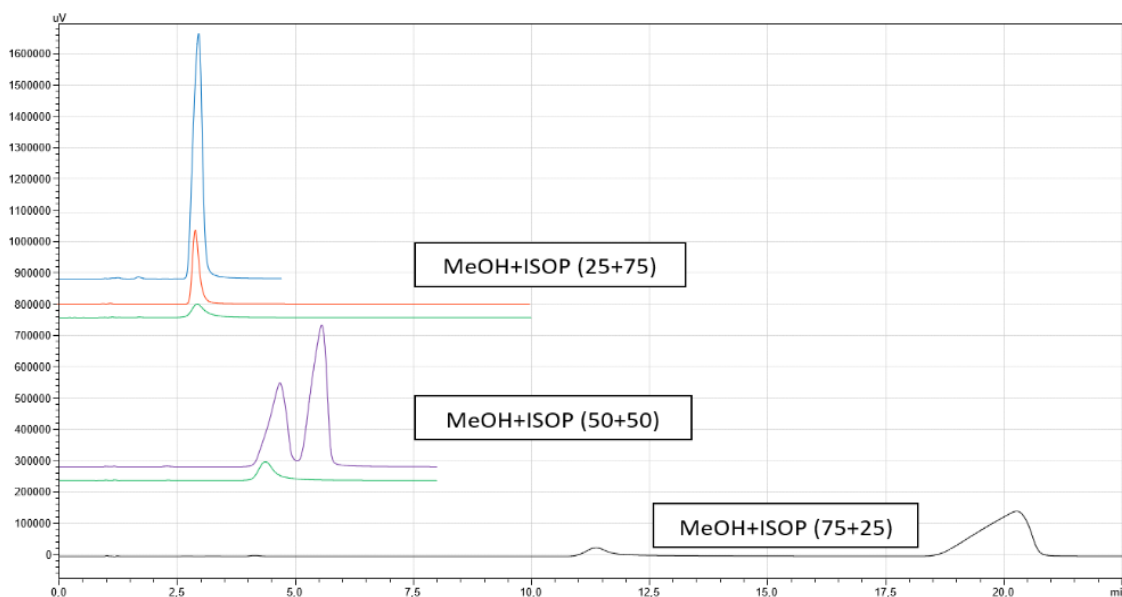
Také byl testován vliv změny poměru mezi složkami organické fáze na rozlišení píků. Byly vybrány mobilní fáze s obsahem CH<sub>3</sub>COOH : MeOH+ISOP (50+50) 75 : 25 a 85 : 15. Při těchto složeních byly retenční časy delší než v případě použití jiných poměrů, jak je vidět na chromatogramu na předchozí straně (obrázek 22). Poměry mezi MeOH a ISOP se měnily a jsou popsány u následujících dvou chromatogramů (obrázek 23 a obrázek 24).

75 : 25	rozlišení mezi píky ACI a GUA
0,1% CH <sub>3</sub> COOH : MeOH+ISOP (25+75)	0,92
0,1% CH <sub>3</sub> COOH : MeOH+ISOP (50+50)	-
0,1% CH <sub>3</sub> COOH : MeOH+ISOP (75+25)	1,78



Obrázek 23 Retenční chování směsného vzorku, vodná : organická složka 75 : 25, mění se poměr mezi MeOH a ISOP. *červená* – samotný ACI, *zelená* – samotný GUA pro porovnání

85 : 15	rozlišení mezi píky ACI a GUA
0,1% CH <sub>3</sub> COOH : MeOH+ISOP (25+75)	-
0,1% CH <sub>3</sub> COOH : MeOH+ISOP (50+50)	1,30
0,1% CH <sub>3</sub> COOH : MeOH+ISOP (75+25)	5,93



Obrázek 24 Retenční chování směsného vzorku, vodná : organická složka 85 : 15, mění se poměr mezi MeOH a ISOP. červená – samotný ACI, zelená – samotný GUA pro porovnání

Při použití vyššího obsahu MeOH docházelo ke značnému prodlužování  $t_R$  a zvyšování rozlišení mezi píky. Naopak vyšší obsah ISOP vedl ke zlepšení symetrie píků, ale rozlišení nebylo dostatečné. Proto byl ponechán poměr MeOH+ISOP 50+50.

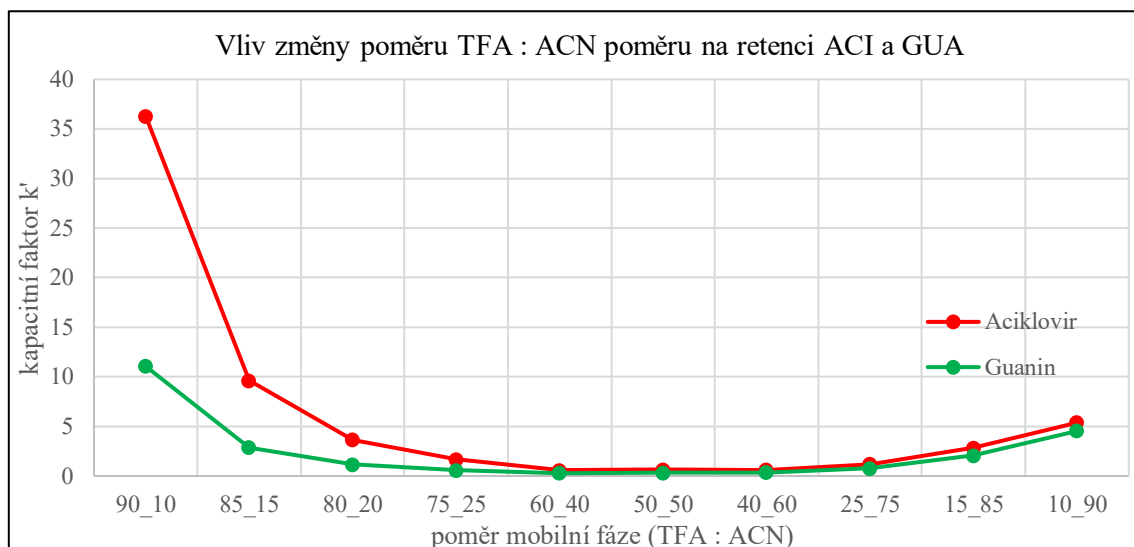
### 5.1.2. Mobilní fáze s obsahem kyseliny trifluoroctové

Byla použita 0,1% kyselina trifluoroctová s totožnými složeními organické složky mobilní fáze a v obdobných poměrech jako tomu bylo v případě 0,1% kys. octové.

#### 5.1.2.1. TFA : ACN

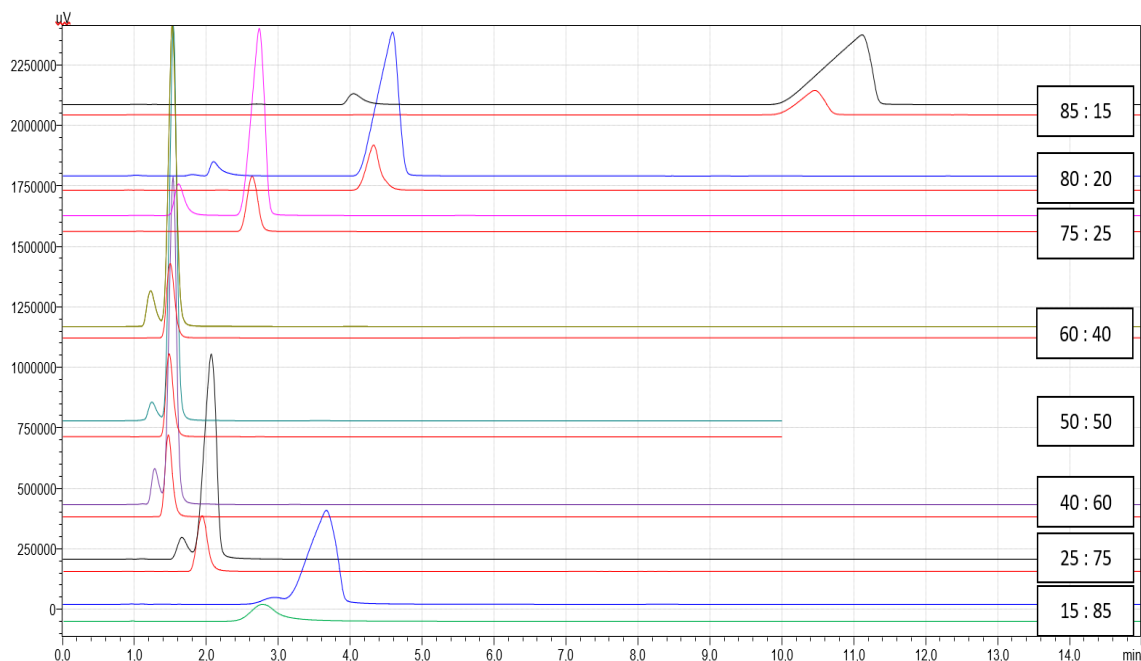
0,1% TFA : ACN							
	pH MF	t <sub>M</sub>	t <sub>R</sub> ACI	t <sub>R</sub> GUA	k' ACI	k' GUA	rozlišení
<b>90 : 10</b>	2,0	1,01	37,71	12,20	36,30	11,07	12,07
<b>85 : 15</b>	2,0	1,05	11,12	4,04	9,61	2,86	8,15
<b>80 : 20</b>	2,0	1,02	4,72	2,19	3,65	1,16	5,70
<b>75 : 25</b>	2,0	1,03	2,73	1,61	1,66	0,57	3,50
<b>60 : 40</b>	2,0	0,96	1,53	1,22	0,60	0,28	1,33
<b>50 : 50</b>	2,0	0,94	1,54	1,24	0,64	0,32	1,37
<b>40 : 60</b>	2,0	0,94	1,53	1,28	0,63	0,36	1,22
<b>25 : 75</b>	1,9	0,94	2,06	1,66	1,21	0,77	1,30
<b>15 : 85</b>	1,7	0,96	3,67	2,95	2,83	2,08	0,89
<b>10 : 90</b>	1,5	0,97	6,22	5,38	5,40	4,54	-

Tabulka 9 Složení MF s obsahem 0,1% TFA : ACN, pH MF a retenční charakteristiky analytů



Graf 6 Vliv změny poměru TFA : ACN na retenci ACI a GUA

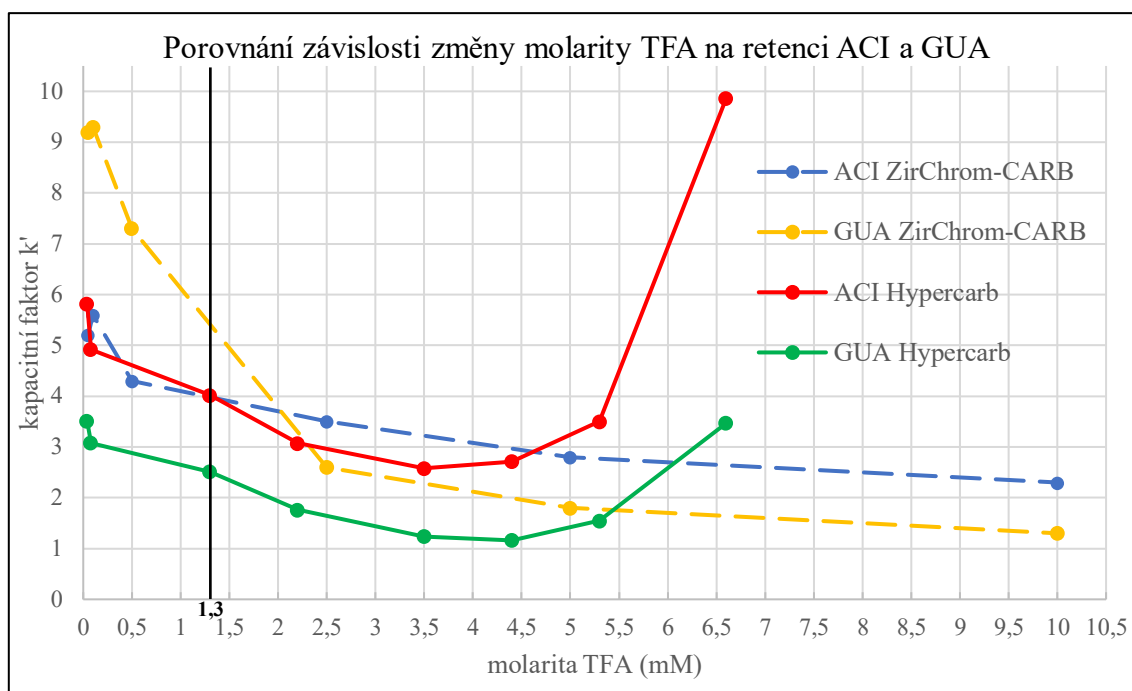




Obrázek 25 Retenční chování směsného vzorku při změnách poměru TFA : ACN.  
*červená – samotný ACI a zelená – samotný GUA pro porovnání*

Na chromatogramu (obrázek 25) je znázorněn přehled retenčního chování analytů v závislosti na změnách poměru mezi 0,1% TFA a ACN. Na rozdíl od mobilní fáze, která obsahovala kyselinu octovou, nedošlo k výměně pořadí píků. Jako první se vždy eluoval GUA , ACI jako druhý. TFA má vyšší eluční sílu než kyselina octová, proto jsou retenční časy analytů kratší a zároveň je lepší symetrie píků. Poměr 90 : 10 není na chromatogramu znázorněn pro  $t_R$  ACI: 37,71 min. U opačného poměru 10 : 90 vykazovaly píky širokou eluční zónu a docházelo k jejich rozmývání, proto v souhrnném chromatogramu také chybí. Při poměrech TFA : ACN 60 : 40; 50 : 50 a 40 : 60 se analyty eluovaly s téměř totožnými retenčními časy.

Obdobný vliv na symetrii píků měl přídavek TFA do mobilní fáze také v případě použití kolony ZirChrom<sup>®</sup>-CARB v diplomové práci Lucie Bouzkové [1]. Graf 7 na následující straně porovnává retence analytů na sorbentech ZirChrom<sup>®</sup>-CARB a Hypercarb<sup>™</sup>.



Graf 7 Porovnání retence analytů na kolonách ZirChrom<sup>®</sup>-CARB a Hypercarb<sup>™</sup> v závislosti na změně molarity TFA

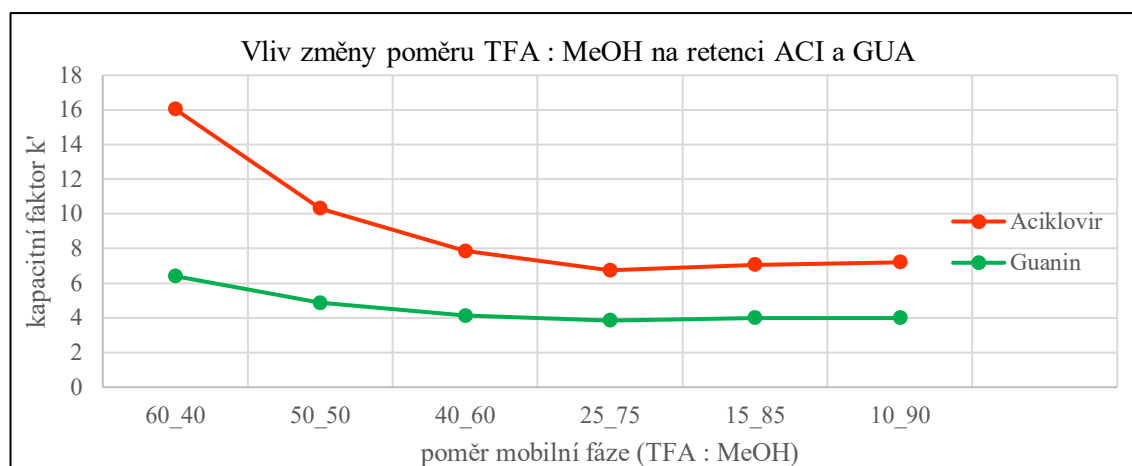
V práci L. Bouzkové byl zachován poměr mezi vodnou a organickou složkou, složení použité mobilní fáze bylo TFA : ACN+MeOH (15 : 85). V této práci se navíc kromě molarity TFA měnil i poměr vodné a organické složky, což mělo na retenci analytů také vliv. Nicméně stejného poměru bylo u obou prací dosaženo při hodnotě 1,3 mM TFA (na grafu 7 zvýrazněno černou čarou). Při této hodnotě je patrné, že retence ACI zůstává stejná, ale výrazně se mění retence GUA.

Na koloně ZirChrom<sup>®</sup>-CARB se retence obou analytů snižovala se zvyšující se koncentrací TFA v mobilní fázi. V případě stacionární fáze na bázi PGC se postupné snižování koncentrace TFA projevilo křivkou připomínající písmeno „U“. To však mohlo být způsobeno vlivem zvyšujícího se obsahu organické složky v mobilní fázi.

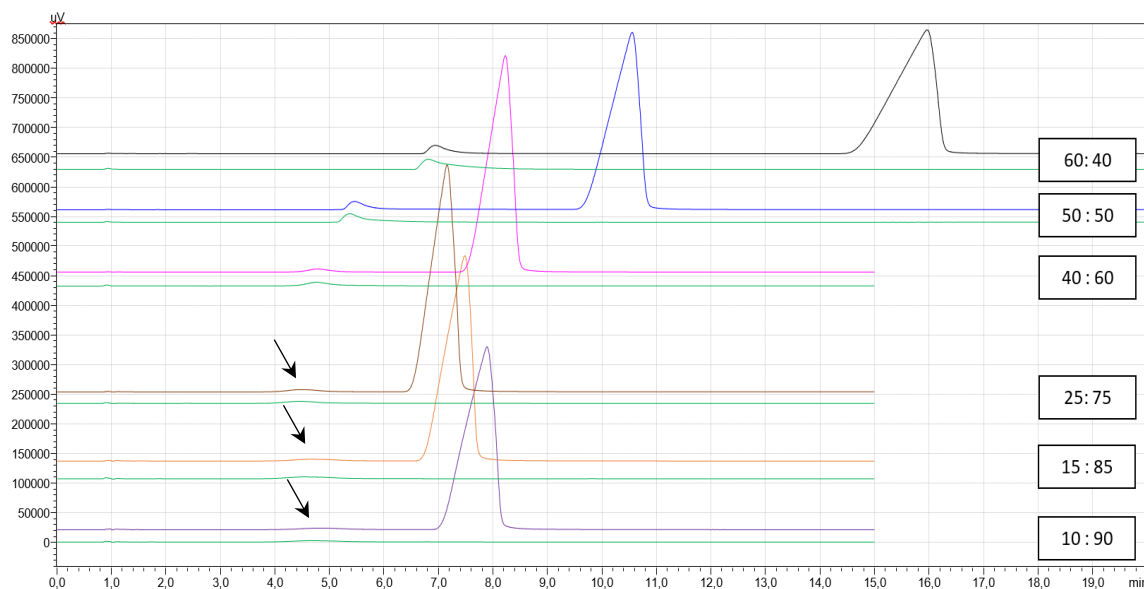
5.1.2.2. TFA : MeOH

0,1% TFA : MeOH							
	pH MF	t <sub>M</sub>	t <sub>R</sub> ACI	t <sub>R</sub> GUA	k' ACI	k' GUA	rozdílení
<b>60 : 40</b>	2,2	0,94	15,97	6,94	16,04	6,41	8,34
<b>50 : 50</b>	2,3	0,93	10,55	5,46	10,32	4,86	6,08
<b>40 : 60</b>	2,4	0,93	8,26	4,78	7,86	4,13	4,07
<b>25 : 75</b>	2,6	0,92	7,16	4,48	6,75	3,84	2,79
<b>15 : 85</b>	2,7	0,93	7,48	4,64	7,07	4,00	2,44
<b>10 : 90</b>	2,7	0,96	7,89	4,80	7,21	3,99	2,29

Tabulka 10 Složení MF s obsahem 0,1% TFA : MeOH, pH MF a retenční charakteristiky analytů



Graf 8 Vliv změny poměru TFA : MeOH na retenci ACI a GUA



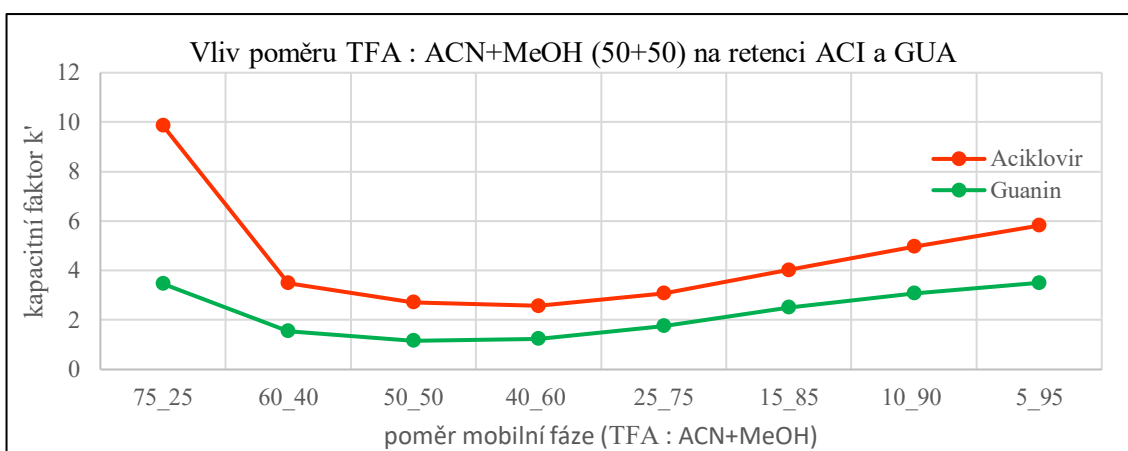
Obrázek 26 Retenční chování směšného vzorku při změnách poměru TFA : MeOH. zelená – samotný GUA pro porovnání, symbol ↘ ukazuje na GUA, který je při daném zobrazení vidět obtížněji.

Při výměně ACN za MeOH došlo k výraznému prodloužení t<sub>R</sub> obou analytů stejně jako v případě MF s kys. octovou. Rozdíl byl však v tom, že nedošlo ke změně pořadí píků (v případě MF s kys. octovou k tomu došlo dvakrát). Jako první se vždy eluoval GUA.

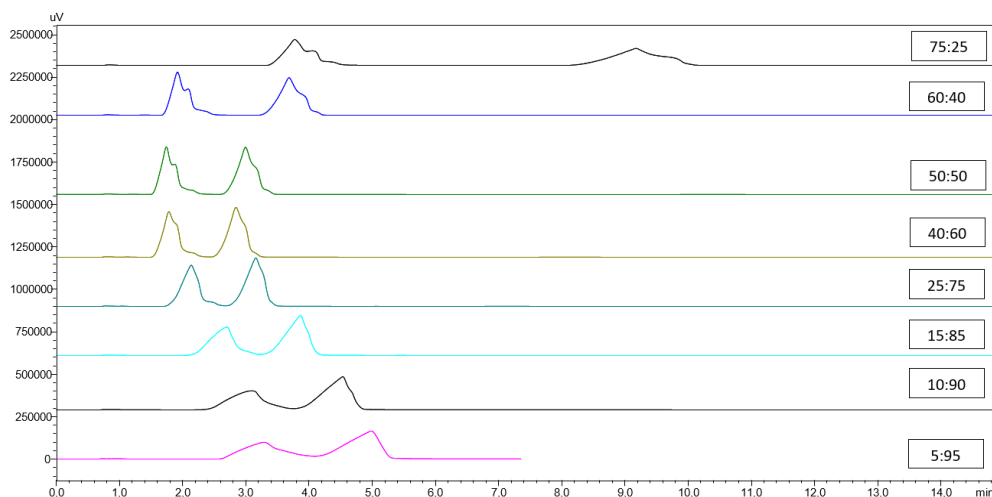
5.1.2.3. TFA : ACN+MeOH

0,1% TFA : ACN+MeOH (50+50)							
	pH MF	t <sub>M</sub>	t <sub>R</sub> ACI	t <sub>R</sub> GUA	k' ACI	k' GUA	rozlišení
75 : 25	2,0	0,85	9,18	3,78	9,86	3,47	5,62
60 : 40	2,1	0,82	3,68	2,09	3,50	1,55	3,53
50 : 50	2,2	0,81	3,00	1,74	2,71	1,16	2,72
40 : 60	2,2	0,80	2,84	1,78	2,58	1,24	2,31
25 : 75	2,2	0,78	3,16	2,14	3,07	1,76	1,94
15 : 85	2,3	0,77	3,86	2,70	4,02	2,51	1,60
10 : 90	2,3	0,76	4,53	3,10	4,97	3,08	1,59
5 : 95	2,3	0,73	4,99	3,29	5,82	3,51	1,57

Tabulka 11 Složení MF s obsahem 0,1% TFA : ACN+MeOH (50+50), pH MF a retenční charakteristiky analytů



Graf 9 Vliv změny poměru TFA : ACN+MeOH na retenci ACI a GUA



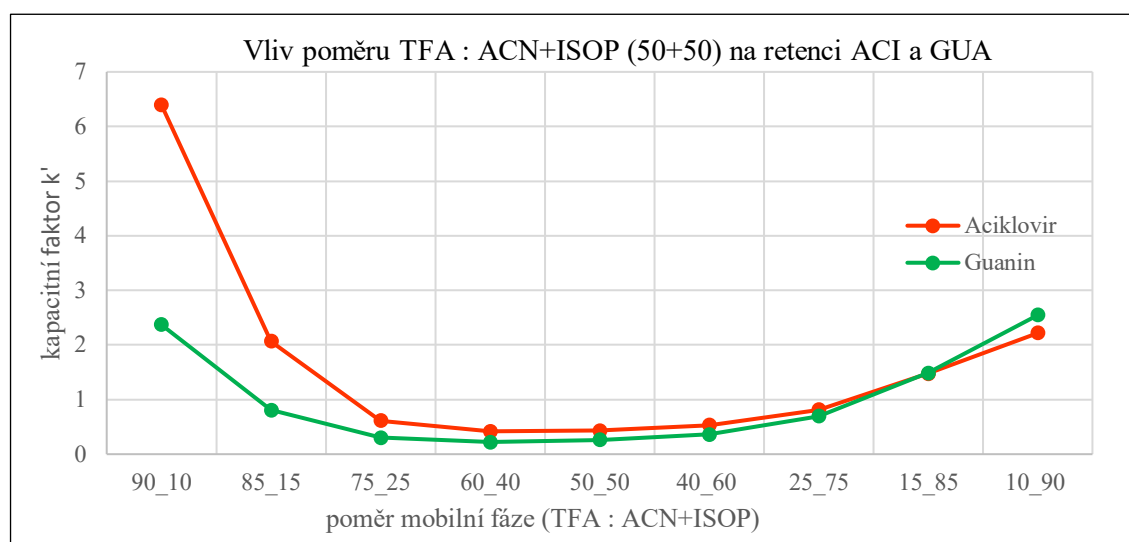
Obrázek 27 Retenční chování směšného vzorku při změnách poměru TFA : ACN+MeOH. první pík – GUA, druhý pík – ACI

Při použití tohoto složení mobilní fáze docházelo ke štěpení píků. To bylo s velkou pravděpodobností způsobeno usazováním TFA na koloně. Proto byla kolona po měření propláchnuta 50% THF při teplotě 70 °C, jak uvádí příručka výrobce [36] a tento postup byl několikrát zopakován.

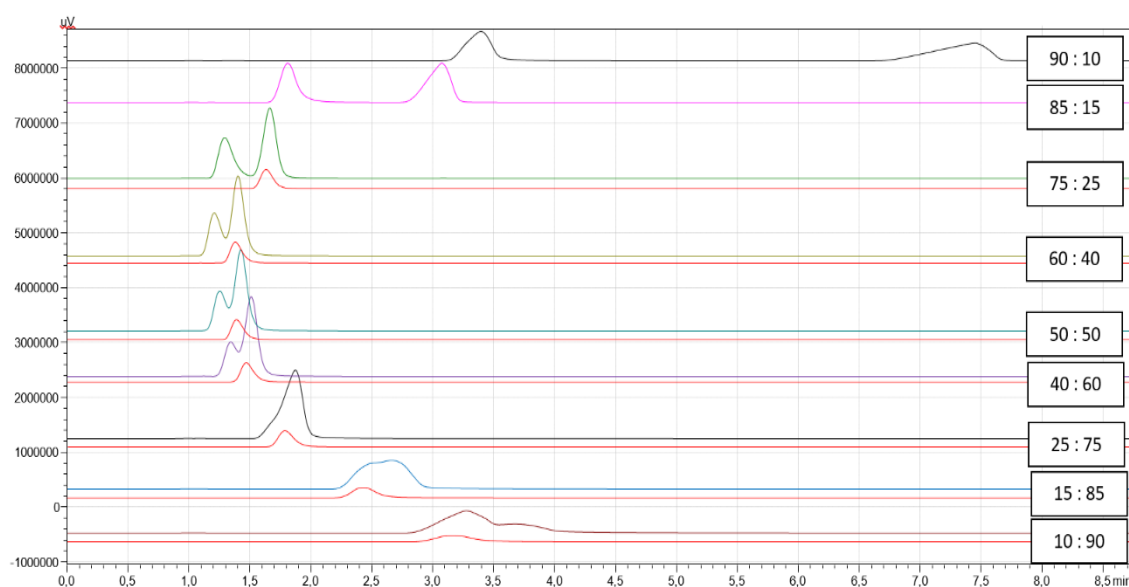
5.1.2.4. TFA : ACN+ISOP

0,1% TFA : ACN+ISOP (50+50)							
	pH MF	t <sub>M</sub>	t <sub>R</sub> ACI	t <sub>R</sub> GUA	k' ACI	k' GUA	rozlišení
90 : 10	2,0	1,01	7,45	3,40	6,39	2,37	6,16
85 : 15	2,0	1,00	3,07	1,81	2,07	0,81	3,92
75 : 25	2,0	0,99	1,60	1,29	0,61	0,30	1,63
60 : 40	2,1	0,99	1,40	1,21	0,42	0,22	0,91
50 : 50	2,2	0,99	1,42	1,25	0,43	0,26	0,76
40 : 60	2,2	0,99	1,51	1,34	0,53	0,36	0,67
25 : 75	2,4	0,98	1,78	1,67	0,81	0,70	-
15 : 85	2,5	0,98	2,43	2,45	1,47	1,49	-
10 : 90	2,5	0,98	3,16	3,48	2,22	2,54	0,27

Tabulka 12 Složení MF s obsahem 0,1% TFA : ACN+ISOP (50+50), pH MF a retenční charakteristiky analytů (zvýrazněn poměr, při kterém došlo ke změně pořadí eluce)



Graf 10 Vliv změny poměru TFA : ACN+ISOP na retenci ACI a GUA



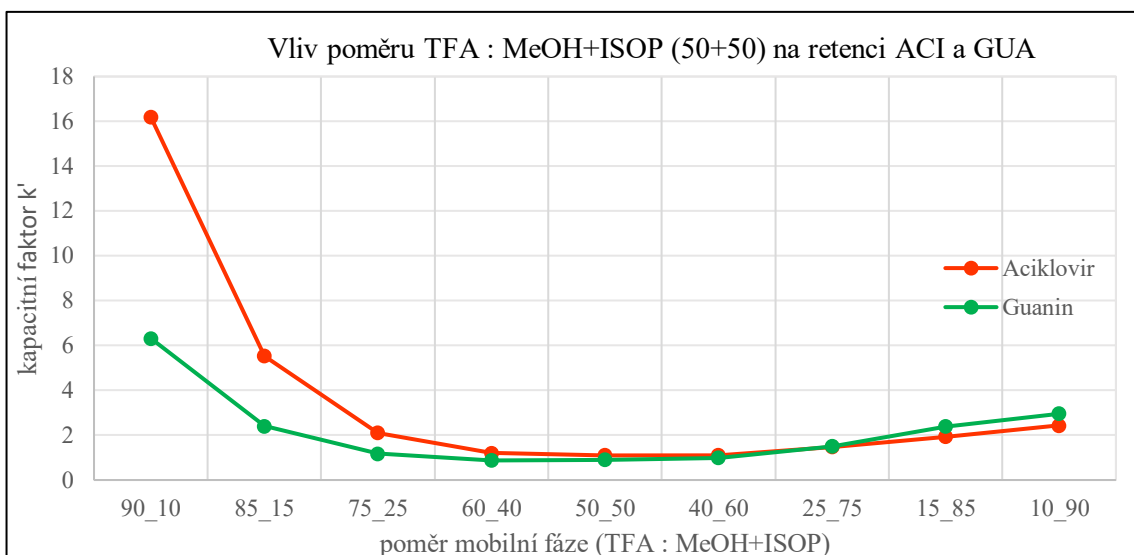
Obrázek 28 Retenční chování směšného vzorku při změnách poměru TFA : ACN+ISOP. červená – samotný ACI pro porovnání, u poměrů 90 : 10 a 85 : 15 je ACI druhý pik

Použití přídavku ISOP výrazně zkrátilo  $t_R$  obou analytů. Při vyšším zastoupení organické fáze docházelo k rozmývání píků. V porovnání s mobilní fází, ve které byla místo TFA použita kys. octová, byly hodnoty rozlišení vyšší. Rozlišení nad 1,5 bylo pozorováno u poměrů 90 : 10, 85 : 15, 75 : 25. Při poměru 15 : 85 došlo ke změně pořadí píků (ACI se eluoval jako první). Byl testován také poměr 5 : 95, ale tam už došlo ke značnému rozmytí píků ( $t_R$  ACI: 5,89 min.,  $t_R$  GUA: 4,79 min., rozlišení: 0,33).

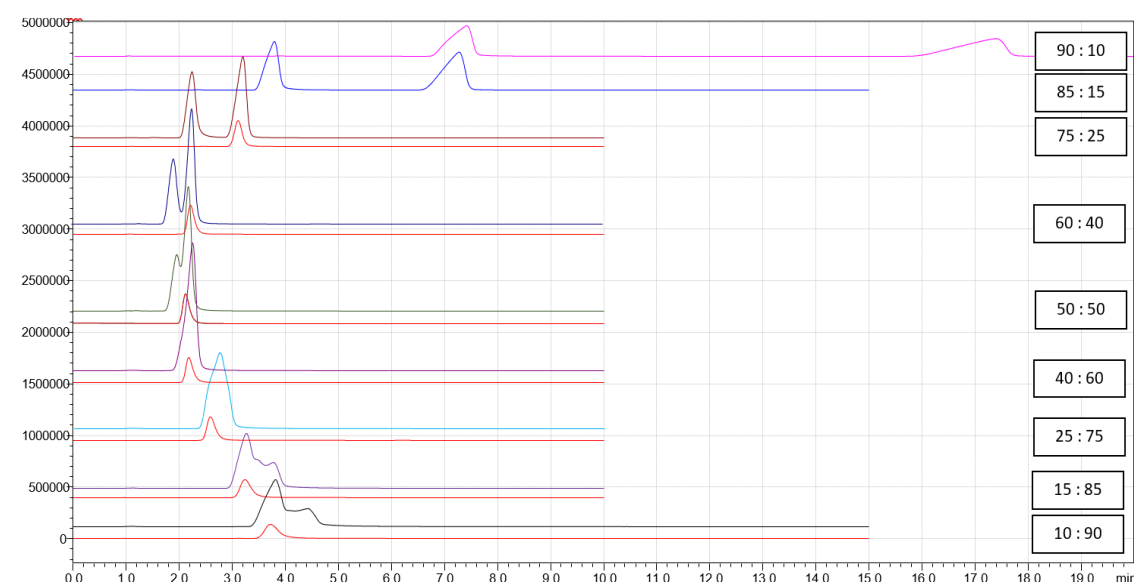
5.1.2.5. TFA : MeOH+ISOP

0,1% TFA : MeOH+ISOP (50+50)							
	pH MF	t <sub>M</sub>	t <sub>R</sub> ACI	t <sub>R</sub> GUA	k' ACI	k' GUA	rozlišení
90 : 10	2,1	1,01	17,37	7,39	16,19	6,32	7,79
85 : 15	2,1	1,11	7,28	3,80	5,53	2,41	5,39
75 : 25	2,1	1,03	3,20	2,24	2,10	1,17	2,73
60 : 40	2,2	1,02	2,26	1,92	1,21	0,87	1,20
50 : 50	2,4	1,03	2,17	1,96	1,11	0,90	0,56
40 : 60	2,5	1,04	2,18	2,06	1,10	0,99	-
25 : 75	2,7	1,05	2,59	2,62	1,48	1,51	-
15 : 85	2,9	1,11	3,27	3,77	1,93	2,39	0,60
10 : 90	2,9	1,11	3,79	4,38	2,43	2,96	0,50

Tabulka 13 Složení MF s obsahem 0,1% TFA : MeOH+ISOP (50+50), pH MF a retenční charakteristiky analytů (zvýrazněn poměr, při kterém došlo ke změně pořadí eluce)



Graf 11 Vliv změny poměru TFA : MeOH+ISOP na retenci ACI a GUA



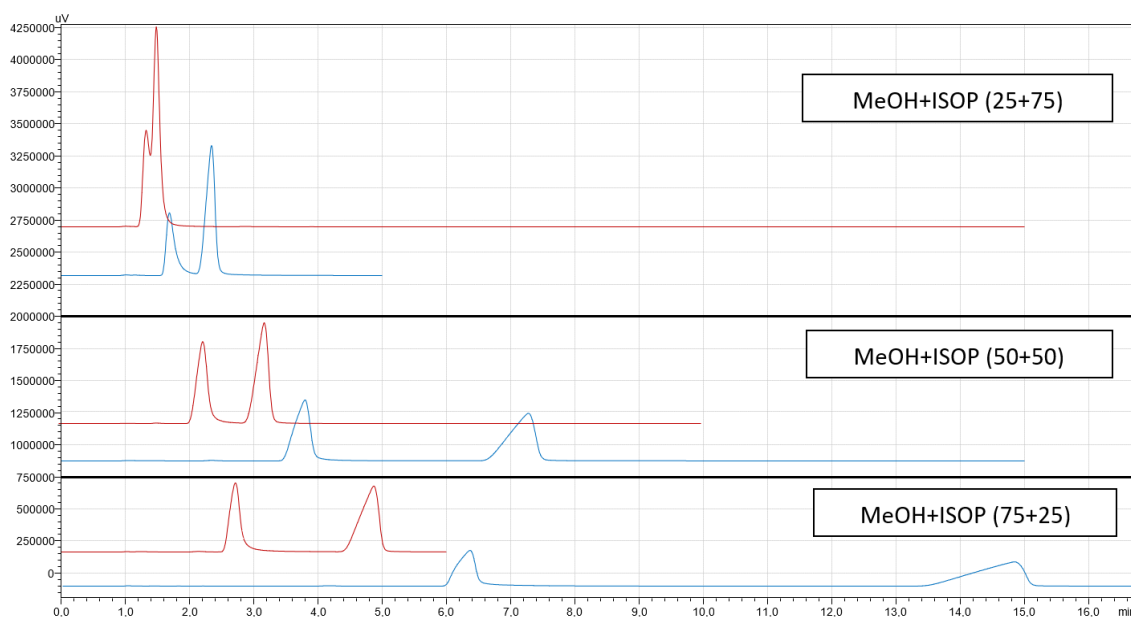
Obrázek 29 Retenční chování směšného vzorku při změnách poměru TFA : MeOH+ISOP. červená – samotný ACI pro porovnání, u poměrů 90 : 10 a 85 : 15 je ACI druhý pik

Oproti použití kys. octové byly vyšší hodnoty rozlišení (u kys. octové to bylo vždy pod 1,5). Při poměru 25 : 75 došlo ke změně pořadí eluce, výrazněji je to na chromatogramu viditelné až u poměru 15 : 85.

Stejně jako v případě použití kys. octové byl testován vliv změny poměru mezi složkami organické fáze. Mobilní fáze obsahovala TFA : MeOH+ISOP **75: 25 (hnědá)** a **85 : 15 (modrá)**. Poměry mezi MeOH a ISOP se měnily a jsou popsány v následujícím chromatogramu (obrázek 30).

<b>75 : 25</b>	<b>rozlišení píků ACI a GUA</b>
<b>0,1% TFA : MeOH+ISOP (25+75)</b>	0,60
<b>0,1% TFA : MeOH+ISOP (50+50)</b>	3,64
<b>0,1% TFA : MeOH+ISOP (75+25)</b>	4,88

<b>85 : 15</b>	<b>rozlišení píků ACI a GUA</b>
<b>0,1% TFA : MeOH+ISOP (25+75)</b>	2,48
<b>0,1% TFA : MeOH+ISOP (50+50)</b>	5,39
<b>0,1% TFA : MeOH+ISOP (75+25)</b>	7,90



Obrázek 30 Porovnání retence při změně poměru mezi MeOH a ISOP v organické fázi, první pík – GUA, druhý pík – ACI, **hnědá** – TFA : MeOH+ISOP **75 : 25**, **modrá** – TFA : MeOH+ISOP **85 : 15**

V porovnání s testováním obdobného složení MF, kde místo TFA byla použita kys. octová, probíhala separace v kratších časech a tvary píků byly symetričtější. Neoptimálněji proběhla separace při složení TFA : MeOH+ISOP 50+50 (75 : 25). Separace s použitím poměru TFA : MeOH+ISOP 75+25 (75 : 25) byla také přijatelná.

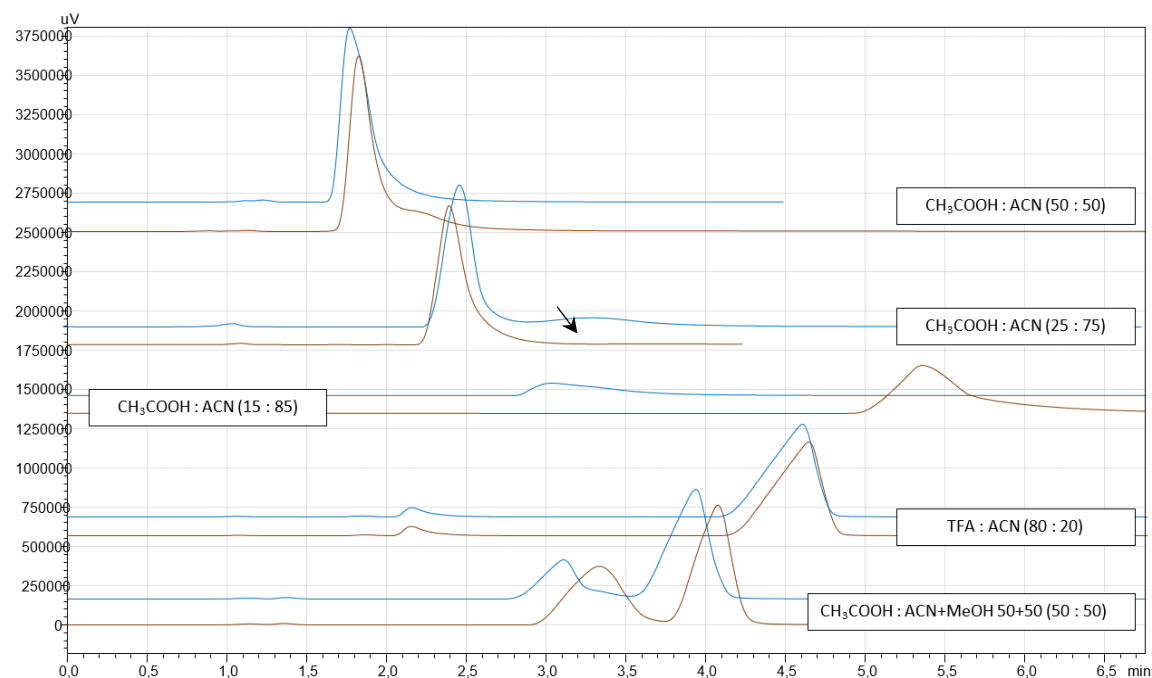


### 5.1.3. Koncentrace pufrů v mobilní fázi

Mobilní fáze obsahující kys. octovou a kys. trifluoroctovou byly připravovány tak, že byl mísen 0,1% roztok daného pufru s organickou fází o určitém poměru HPLC systémem. S poklesem obsahu vodné složky tak docházelo i k poklesu koncentrace pufru, což ovlivňovalo hodnotu pH MF. Proto bylo zkoumáno, do jaké míry se retenční chování analytů a pH MF bude lišit od případu, že by zůstala zachována 0,1% koncentrace pufru v celkovém objemu MF. Toto bylo testováno u následujících mobilních fází:

složení MF	rozlišení 0,1 % pufru v celkovém objemu MF	rozlišení 0,1 % pufru ve vodné složce MF	pH MF 0,1 % pufru v celkovém objemu MF	pH MF 0,1 % pufru ve vodné složce MF
0,1% CH <sub>3</sub> COOH : ACN (50 : 50)	-	-	3,5	3,7
0,1% CH <sub>3</sub> COOH : ACN (25 : 75)	1,05	1,09	3,6	3,9
0,1% CH <sub>3</sub> COOH : ACN (15 : 85)	-	-	3,6	4,0
0,1% TFA : ACN (80 : 20)	5,63	5,70	1,4	2,0
0,1% CH <sub>3</sub> COOH : ACN+MeOH 50+50 (50 : 50)	1,77	1,33	3,7	3,8

Tabulka 14 Rozdíly pH MF a rozdíly v rozlišeních píků při použití MF s 0,1% obsahem pufru v celém objemu a 0,1% obsahem pouze ve vodné složce



Obrázek 31 Porovnání retenčního chování směšného vzorku. *modrá* – MF obsahovala 0,1 % pufru v celém objemu. *hnědá* – 0,1 % pufru bylo obsaženo pouze ve vodné složce, symbol ↘ ukazuje na GUA s  $t_R$  3,28, jehož pík při daném zobrazení není viditelný.

Obecně probíhaly separace nejlépe u poměrů s vyšším zastoupením vodné složky, při kterých byla odchylka koncentrací nižší. Z tabulky 14 na předchozí straně je zřejmé, že hodnota pH se nejvíce odlišovala v případě mobilní fáze TFA : ACN (80: 20). Přesto se retenční časy změnilo jen minimálně, jak je patrné na chromatogramu (obrázek 31). Rozlišení také zůstalo obdobné. Je tedy možné, že se při separaci příliš neuplatňoval vliv hodnoty pH a retence byla ovlivňována spíše samotnou polaritou a planaritou analytů.

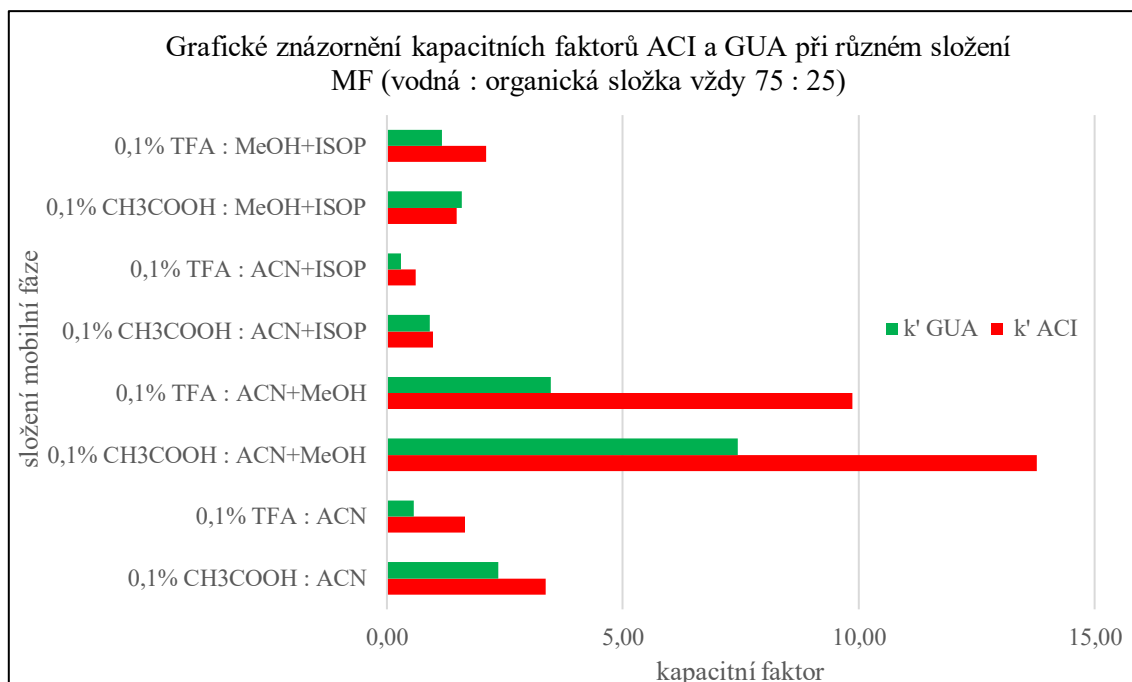
K výraznějšímu posunu  $t_R$  došlo při složení MF  $\text{CH}_3\text{COOH}$  : ACN (15 : 85).  $t_R$  se zkrátily o 2,35 minut, překryv píků však zůstal zachován. Také v tomto případě byl zaznamenán výraznější rozdíl mezi hodnotami pH.

#### 5.1.4. Souhrn výsledků s kyselinou octovou a kyselinou trifluoroctovou

Tato podkapitola obsahuje porovnání retence analytů v závislosti na použití rozdílné organické složky a rozdílného pufru (0,1% kys. octová nebo 0,1% kys. trifluoroctová). Tabulka 15 znázorňuje souhrn všech zkoušených kombinací mobilních fází v poměru 75 : 25, s výjimkou mobilních fází s obsahem samotného MeOH, při kterých nebyl daný poměr proměřován z důvodu dlouhých  $t_R$  analytů. Pro lepší přehled jsou kapacitní faktory znázorněny také v grafu 12.

kapacitní faktory u poměru 75 : 25		
složení MF	k' ACI	k' GUA
0,1% CH <sub>3</sub> COOH : ACN	3,37	2,36
0,1% TFA : ACN	1,66	0,57
0,1% CH <sub>3</sub> COOH : MeOH		
0,1% TFA : MeOH		
0,1% CH <sub>3</sub> COOH : ACN+MeOH (50+50)	13,78	7,44
0,1% TFA : ACN+MeOH (50+50)	9,86	3,47
0,1% CH <sub>3</sub> COOH : ACN+ISOP (50+50)	0,98	0,91
0,1% TFA : ACN+ISOP (50+50)	0,61	0,3
0,1% CH <sub>3</sub> COOH : MeOH+ISOP (50+50)	1,48	1,59
0,1% TFA : MeOH+ISOP (50+50)	2,1	1,17

Tabulka 15 Kapacitní faktory ACI a GUA při různém složení MF (vodná : organická složka vždy 75 : 25). U MF s obsahem samotného MeOH, nebyl daný poměr proměřován z důvodu dlouhých  $t_R$  analytů.



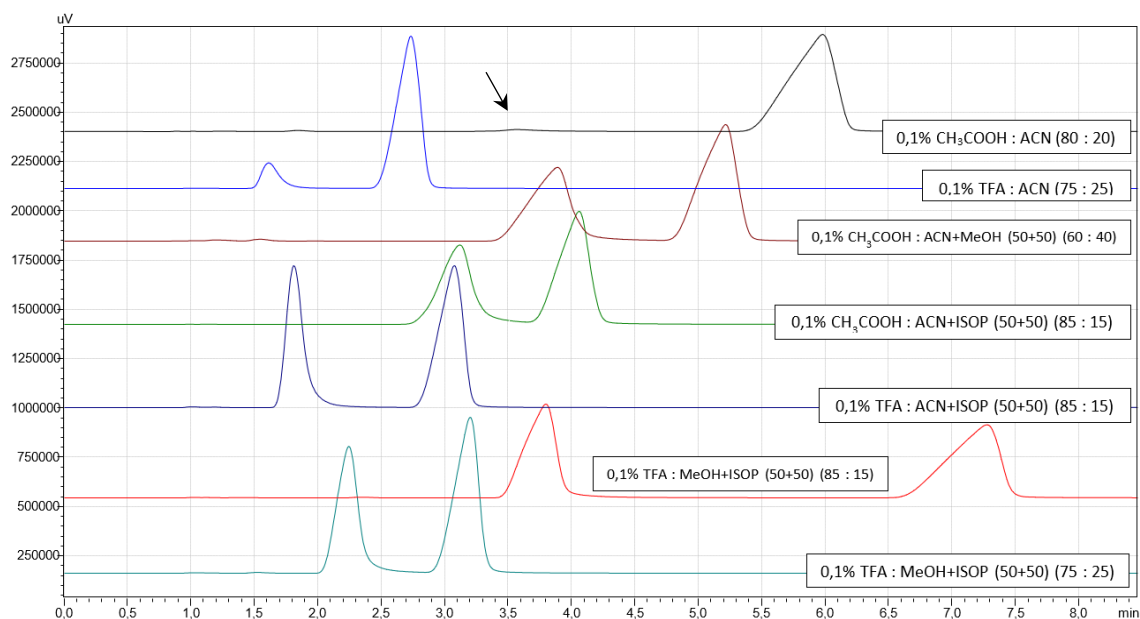
Graf 12 Grafické znázornění kapacitních faktorů ACI a GUA při různém složení MF (vodná : organická složka vždy 75 : 25)

Dále byly vybrány nejlepší separace na základě námi zvolených kritérií. Požadavkem byla doba analýzy nepřekračující 10 minut, symetrie píků v rozmezí hodnot 0,7-2,0 a rozlišení mezi píky alespoň 2,0. Obvykle je dostačující rozlišení 1,5. Hodnota 2,0 byla zvolena pro zajištění dostatečného rozlišení i v případě hodnocení ACI jako substance léčivé látky.

Vybrané separace, které odpovídaly těmto kritériím jsou popsány v tabulce 16 a znázorněny na následujícím souhrnném chromatogramu (obrázek 32).

	<b>k'</b> <b>ACI</b>	<b>k'</b> <b>GUA</b>	<b>A<sub>s</sub></b> <b>ACI</b>	<b>A<sub>s</sub></b> <b>GUA</b>	<b>rozlišení</b>
<b>0,1% CH<sub>3</sub>COOH : ACN (80 : 20)</b>	5,77	3,04	0,7	1,65	3,83
<b>0,1% TFA : ACN (75 : 25)</b>	1,66	0,57	0,81	1,63	3,53
<b>0,1% CH<sub>3</sub>COOH : ACN+MeOH 50+50 (60 : 40)</b>	3,36	2,25	0,75	0,88	2,22
<b>0,1% CH<sub>3</sub>COOH : ACN+ISOP 50+50 (85 : 15)</b>	4,79	3,45	0,78	1,05	2,02
<b>0,1% TFA : ACN+ISOP 50+50 (85 : 15)</b>	2,07	0,81	0,78	1,39	3,92
<b>0,1% TFA : MeOH+ISOP 50+50 (85 : 15)</b>	5,53	2,41	0,71	0,83	5,39
<b>0,1% TFA : MeOH+ISOP 50+50 (75 : 25)</b>	2,1	1,17	0,79	1,1	2,73

Tabulka 16 Hodnocené parametry vybraných separací



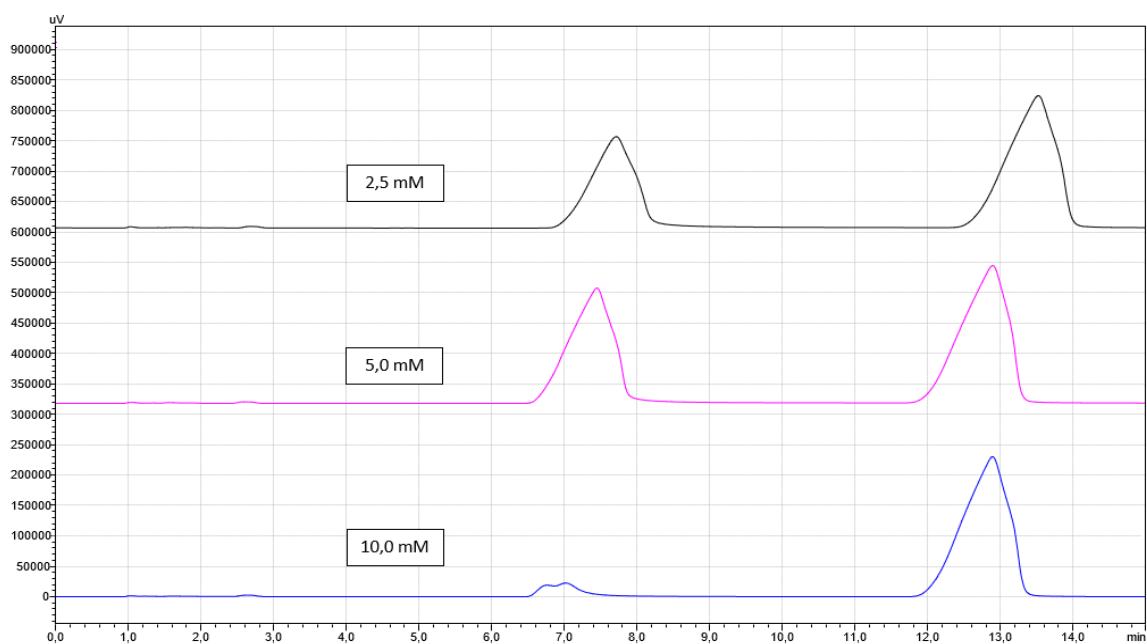
Obrázek 32 Chromatogramy vybraných separací, které odpovídaly hodnotícím kritériím, symbol ↘ ukazuje na GUA, který je při daném zobrazení vidět obtížněji.

## 5.2. Vliv fluoridu amonného na retenci

Fluorid amonný byl zvolen na základě slibných výsledků diplomové práce L. Teplé [2]. Byl sledován vliv změny molarity na retenci ACI a GUA. Vycházelo se z poměru  $\text{NH}_4\text{F} : \text{ACN}$  (85 : 15), který v případě použití TFA a  $\text{CH}_3\text{COOH}$  místo  $\text{NH}_4\text{F}$  vykazoval poměrně dlouhou dobu analýzy. Testovalo se, zda se  $t_R$  zkrátí (v případě předchozí diplomové práce se  $t_R$  pohybovaly do 8 minut). Mobilní fáze obsahovaly 2,5 mM; 5,0 mM a 10,0 mM  $\text{NH}_4\text{F}$  v celkovém objemu.

NH <sub>4</sub> F : ACN (85 : 15)							
molarita NH <sub>4</sub> F v MF	pH MF	t <sub>M</sub>	t <sub>R</sub> ACI	t <sub>R</sub> GUA	k' ACI	k' GUA	rozlišení
2,5 mM	5,7	1,04	13,53	7,72	12,03	6,44	4,63
5,0 mM	5,7	1,07	12,90	7,45	11,11	6,00	4,39
10,0 mM	6,1	1,06	12,90	6,88	11,20	5,50	5,77

Tabulka 17 Složení MF s obsahem  $\text{NH}_4\text{F} : \text{ACN}$  (85 : 15), pH MF a retenční charakteristiky analytů v závislosti na molaritě



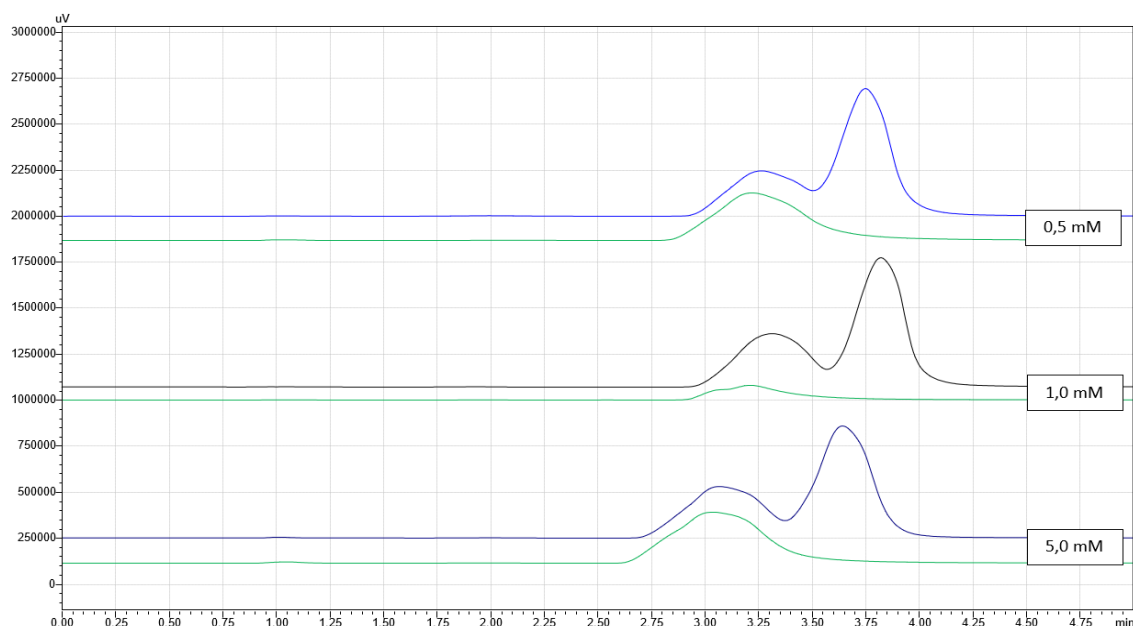
Obrázek 33 Retenční chování směsného vzorku při různých molaritách fluoridu amonného. první pik – GUA, druhý pik – ACI

Retenční časy se namísto zkrácení spíše prodloužily i symetrie píků se zhoršila, a proto byl k ACN přidán propan-2-ol. Ten v předchozích měřeních analýzy urychloval a pokud byl v menším zastoupení oproti vodné fázi, měl pozitivní vliv na tvar píků.

Mobilní fáze s propan-2-olem obsahovaly 0,5 mM; 1,0 mM; 5,0 mM NH<sub>4</sub>F v celkovém objemu a jejich složení je popsáno v tabulce 18.

NH <sub>4</sub> F : ACN+ISOP (50+50) (85 : 15)							
molarita NH <sub>4</sub> F v MF	pH MF	t <sub>M</sub>	t <sub>R</sub> ACI	t <sub>R</sub> GUA	k' ACI	k' GUA	rozlišení
0,5 mM	6,0	0,99	3,74	3,29	2,78	2,32	0,83
1,0 mM	6,0	0,97	3,82	3,32	2,92	2,40	0,99
5,0 mM	6,1	1,07	3,64	3,07	2,43	1,97	1,01

Tabulka 18 Složení MF s obsahem NH<sub>4</sub>F : ACN+ISOP (50+50) (85 : 15), pH MF a retenční charakteristiky analytů v závislosti na molaritě



Obrázek 34 Retenční chování směsného vzorku při různých molaritách fluoridu amonného. zelená – samotný GUA pro porovnání

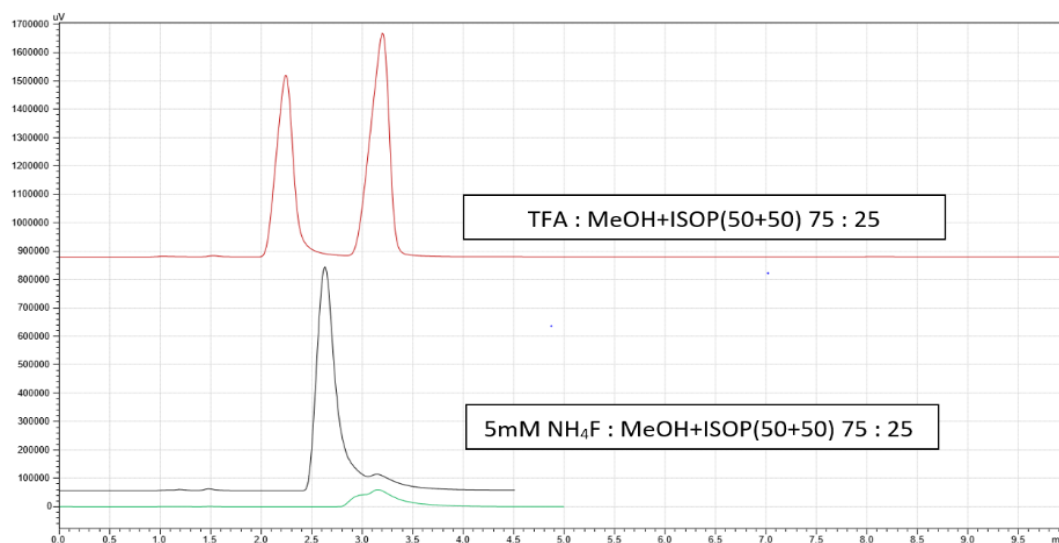
Díky ISOP se t<sub>R</sub> obou analytů výrazně zkrátily. Neočekávaně se však zhoršila symetrie píků a ani jejich rozlišení neodpovídalo námi zvoleným kritériím pro optimální separaci.

Poslední testované mobilní fáze s NH<sub>4</sub>F obsahovaly organickou složku tvořenou směsí MeOH+ISOP (50+50). Poměr vodné a organické složky činil 75 : 25. Toto složení bylo v případě použití 0,1% kys. trifluoroctové shledáno jako optimální z hlediska délky analýzy, rozlišení a symetrie píků. Proto bylo testováno také s fluoridem amonným. Mobilní fáze obsahovaly 1,0 mM; 5,0 mM NH<sub>4</sub>F v celkovém objemu.

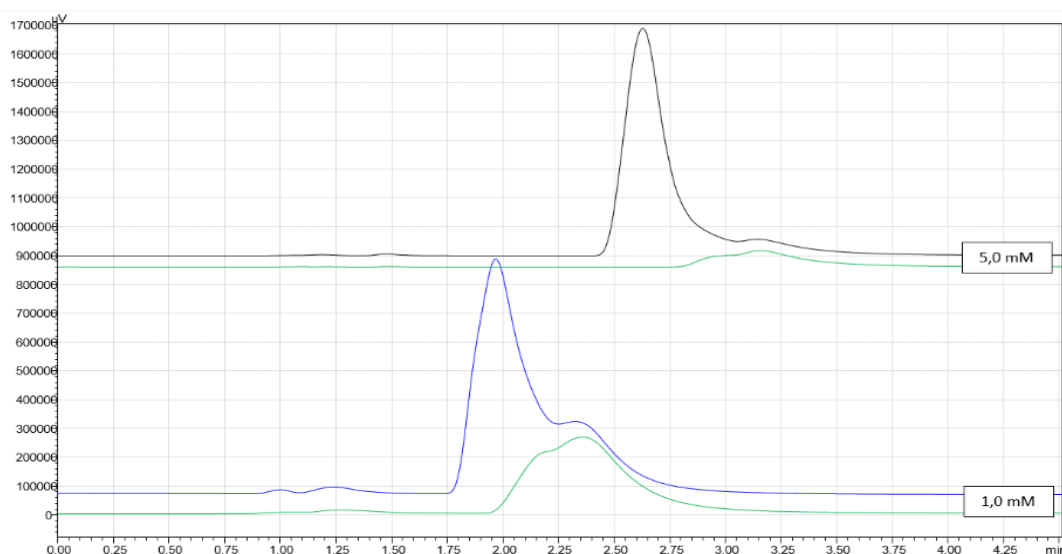
Ve výsledku však bylo pozorováno horší rozlišení i symetrie píků než v případě použití TFA, jak je znázorněno na chromatogramu (obrázek 35). Další chromatogram (obrázek 36) pak porovnává retenci směšného vzorku při použití 5 mM a 1 mM NH<sub>4</sub>F.

NH <sub>4</sub> F : MeOH+ISOP (50+50) (75 : 25)							
molarita NH <sub>4</sub> F v MF	pH MF	t <sub>M</sub>	t <sub>R</sub> ACI	t <sub>R</sub> GUA	k' ACI	k' GUA	rozlišení
1,0 mM	6,2	1,00	1,98	2,38	1,02	1,38	0,27
5,0 mM	6,2	1,19	2,63	3,15	1,29	1,65	0,98

Tabulka 19 Složení MF s obsahem NH<sub>4</sub>F : MeOH+ISOP (50+50) (75 : 25), pH MF a retenční charakteristiky analytů v závislosti na molaritě



Obrázek 35 Porovnání retence směšného vzorku při použití 0,1% TFA a 5 mM NH<sub>4</sub>F. zelená – samotný GUA pro porovnání. první pik na hnědém chromatogramu – GUA, druhý pik – ACI



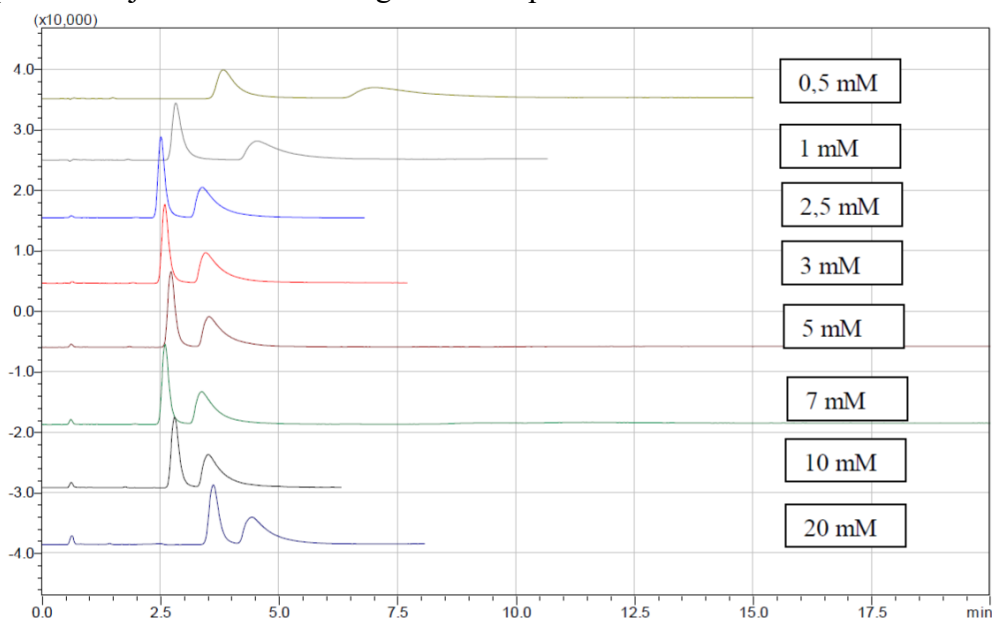
Obrázek 36 Porovnání retence směšného vzorku při použití 5 mM a 1 mM NH<sub>4</sub>F. zelená – samotný GUA pro porovnání

V diplomové práci L. Teplé bylo na koloně ZirChrom®-CARB dosaženo nejlepších výsledků při použití NH<sub>4</sub>F ve vodné složce mobilní fáze se složením:

- vodná složka : ACN : MeOH (15 : 60 : 25) s obsahem 5mM fluoridu amonného

Jako první se v tomto případě eluoval ACI s  $t_R$  2,90 min a za ním GUA s  $t_R$  3,60 min.

Pro porovnání je vložen chromatogram z této práce:



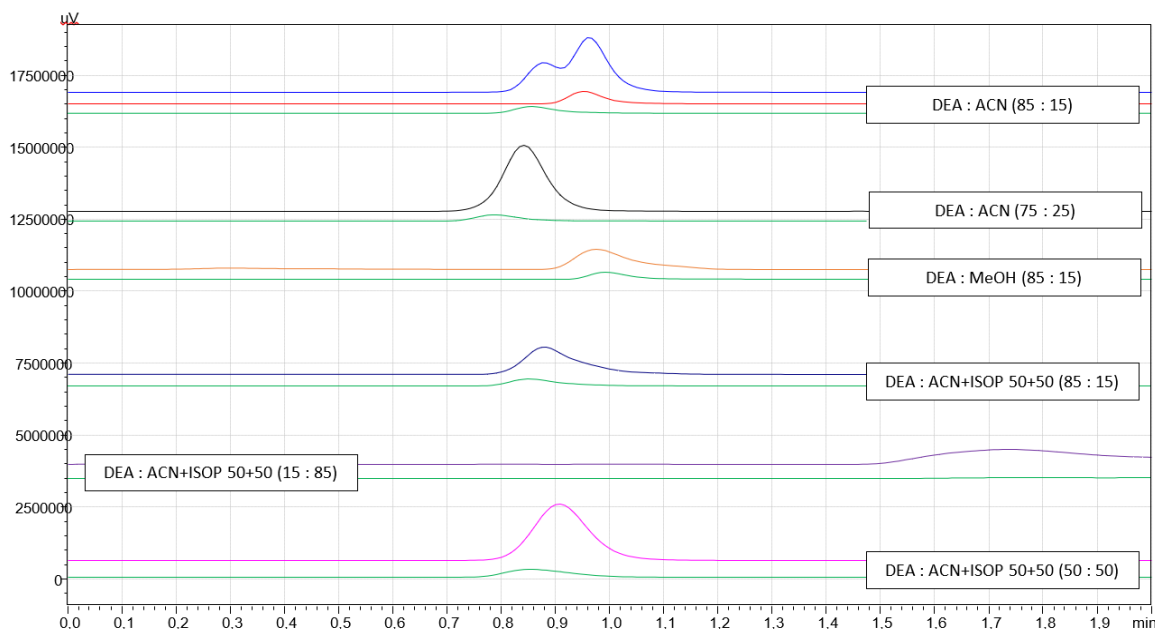
Obrázek 37 Retenční chování směsného vzorku acikloviru (vždy první pík) a guaninu (druhý pík) v závislosti na koncentraci fluoridu amonného v mobilní fázi. Převzato z předchozí DP [2].

Na koloně Hypercarb™ se analyty eluovaly v opačném pořadí než na koloně ZirChrom®-CARB, Výjimku tvořili mobilní fáze, u kterých byl součástí organické složky MeOH. Použití NH<sub>4</sub>F se u kolony Hypercarb™ jevílo jako méně vhodné ve srovnání s pufrý obsahující kyseliny. Byla horší symetrie i rozlišení píků. Při použitém rozsahu molarit fluoridu amonného nedocházelo k výrazným změnám retence.



### 5.3. Vliv diethylaminu na retenci

Byly připraveny mobilní fáze s obsahem 0,1% DEA v celkovém objemu. Vodná fáze byla mísená v různých poměrech s ACN, MeOH, MeOH+ISOP a ACN+ISOP. Konkrétní složení jsou popsána v následujícím chromatogramu (obrázek 38).



Obrázek 38 Retenční chování směsného vzorku při použití různých MF s obsahem 0,1% DEA, zelená – samotný GUA pro porovnání

Při použití DEA docházelo k eluci analytů spolu s mrtvým retenčním časem. Pouze při složení DEA : ACN+ISOP 50+50 (15 : 85) došlo ke zvýšení retence, avšak zároveň ke značnému rozmytí píků, proto se GUA na tomto chromatogramu jeví jako rovná linie (při větším přiblížení byla zjistitelná hodnota  $t_R$  1,82 min). Z těchto důvodů byl DEA shledán jako nevhodný pro tuto analýzu a chromatogram je vložen spíše pro ilustraci.

## 5.4. Vliv změny poměru v mobilní fázi s obsahem fosforečnanů

### 5.4.1. Mobilní fáze s tlumivým roztokem fosforečnanovým o pH 7,0 (2) dle ČL 2017

Pro další analýzu byly použity mobilní fáze s tlumivým roztokem fosforečnanovým o pH 7,0 (2) a molaritě 5,0 mM. Organickou složku tvořil ACN, MeOH a MeOH+ISOP (50+50).

V případě, kdy byl použit samotný ACN se oba analyty eluovaly společně v oblasti  $t_M$ . Až s vyšším zastoupením vodné fáze, a to při poměru 85 : 15, došlo k prodloužení  $t_R$  (GUA se eluoval v čase 4,80 min a ACI v čase 10,03 min).

Po výměně ACN za MeOH došlo k výraznému prodloužení  $t_R$ . Z předchozích měření s přítomností MeOH v mobilní fázi bylo zřejmé, že pro výraznou retenci nemá smysl zkoušet poměry s vysokým obsahem vodné fáze. Proto byly proměřeny následující poměry:

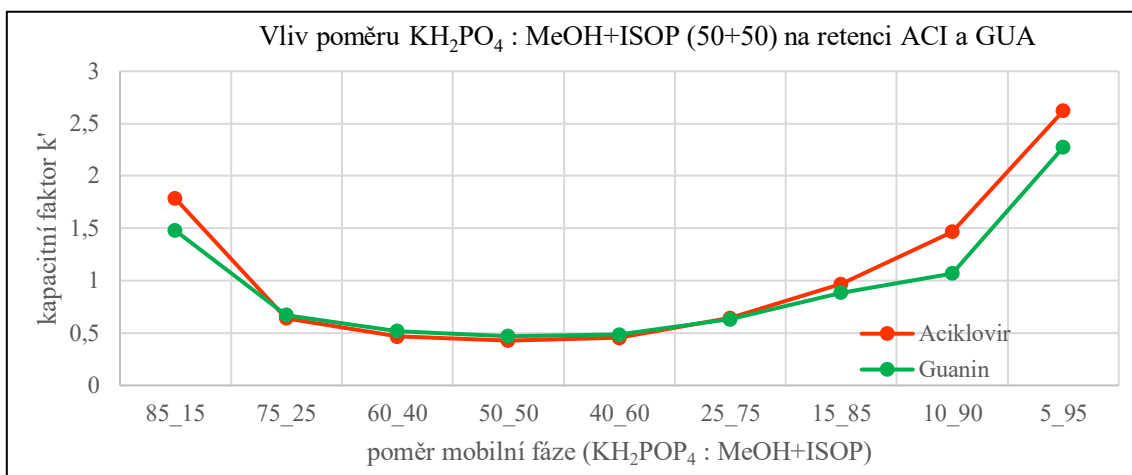
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : MeOH 60 : 40 (GUA: 7,45 min a ACI 13,3 min)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : MeOH 50 : 50 (GUA 4,90min a ACI 7,84 min)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : MeOH 40 : 60 (GUA 3,79 min a ACI 5,58 min)

Ve všech případech, kdy mobilní fáze obsahovala tlumivý roztok fosforečnanový o pH 7 (2), byly píky na chromatogramech asymetrické a jejich rozlišení prakticky nulové. Navíc se vyskytovaly problémy s jejich štěpením.

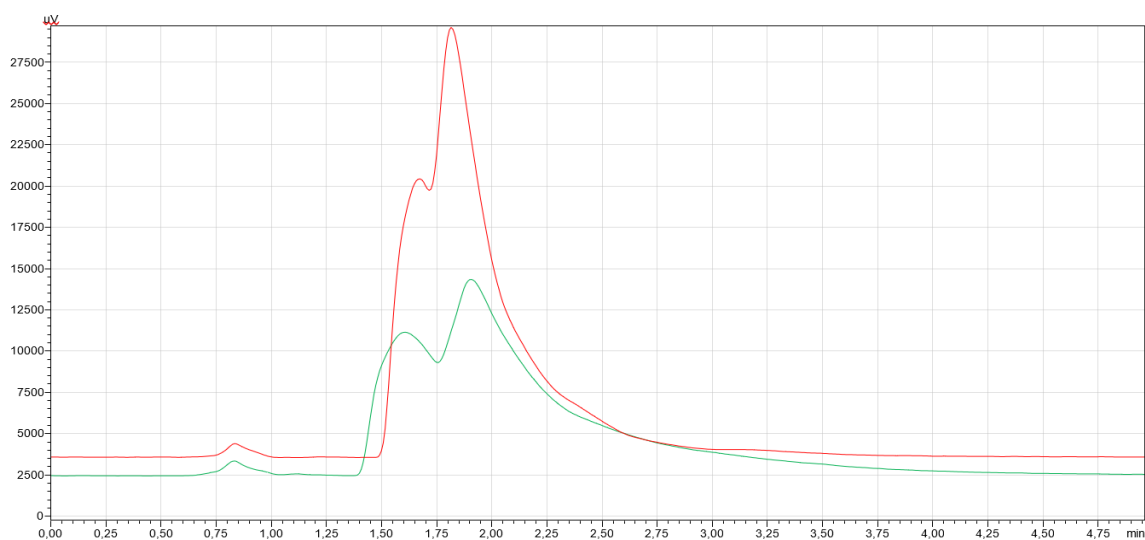
Pro znázornění byly vybrány výsledky analýzy s použitím mobilní fáze s obsahem  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : MeOH+ISOP (50+50). Poměry složek jsou popsány v tabulce 20. Ani v tomto případě nedocházelo k separaci a píky byly rozštěpené, viz chromatogram (obrázek 39).

<b><math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math> : MeOH+ISOP (50+50)</b>							
	pH MF	$t_M$	$t_R$ ACI	$t_R$ GUA	$k'$ ACI	$k'$ GUA	rozlišení
<b>85 : 15</b>	7,6	0,84	2,35	2,09	1,78	1,48	0,09
<b>75 : 25</b>	7,8	0,81	1,33	1,35	0,64	0,67	-
<b>60 : 40</b>	8,2	0,77	1,14	1,18	0,47	0,52	-
<b>50 : 50</b>	8,4	0,79	1,13	1,16	0,43	0,47	-
<b>40 : 60</b>	8,7	0,80	1,16	1,18	0,45	0,49	-
<b>25 : 75</b>	9,4	0,80	1,31	1,30	0,64	0,63	-
<b>15 : 85</b>	9,8	0,85	1,67	1,60	0,97	0,89	-
<b>10 : 90</b>	9,8	0,87	2,15	1,80	1,46	1,07	0,09
<b>5 : 95</b>	10,0	0,88	3,17	2,86	2,62	2,27	-

Tabulka 20 Složení MF s obsahem  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : MeOH+ISOP (50+50), pH MF a retenční charakteristiky analytů (zvýrazněny poměry, kdy došlo k výměně pořadí píků)



Graf 13 Vliv změny poměru  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : MeOH+ISOP na retenci ACI a GUA



Obrázek 39 Chromatogram znázorňující ACI a GUA při poměru  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : MeOH+ISOP (50+50) 15 : 85

#### 5.4.2. Mobilní fáze s fosforečnanovým pufrem s obsahem sodných solí o pH 7,0

Dále byl zjišťován vliv záměny draselné soli fosforečnanové za sodnou. Použita byla mobilní fáze s obsahem fosforečnanového pufru, který byl tvořen kombinací hydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu a dihydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu ve vzájemném poměru 390 : 610 na 1000 ml. Výsledná koncentrace fosforečnanů v mobilní fázi byla 2,5 mM. Vodná složka byla míchána s MeOH v poměru 50 : 50.

- pH vodné složky s fosforečnanovým pufrem: 7,0
- pH celé mobilní fáze: 8,2

Nedošlo k žádné výrazné změně retence oproti použití dihydrogenfosforečnanu draselného, navíc přetrvával problém se štěpením píků, a tak se v dalších měřeních s použitím tohoto pufru nepokračovalo.

Obdobně jako v případě fluoridu amonného byly výsledky s použitými fosforečnany v mobilní fázi na koloně ZirChrom<sup>®</sup>-CARB, použité v předchozí práci, příznivější.

#### 5.5. Testování čistoty acikloviru

Na závěr bylo testováno, zda vybraná optimální mobilní fáze může být použita pro hodnocení čistoty acikloviru, resp. kvantifikaci guaninu jako nečistoty. Dle lékopisných parametrů pro zkoušku Příbuzné látky je limit pro obsah guaninu jako nečistoty B v acicloviru 0,7 % [3].

Vzorek acikloviru (25 µg/ml) byl připraven ředěním ze zásobního roztoku ACI s přídavkem GUA (0,7%). Tedy ve 40× nižší koncentraci, než je předepsáno u zkoušeného roztoku v ČL 2017. K tomuto způsobu bylo přistoupeno z důvodu obavy ze zanesení kolony vysokou koncentrací ACI. Vzorek byl analyzován s použitím mobilní fáze o složení TFA : MeOH+ISOP 50+50 (75 : 25).

Na chromatografickém záznamu nebyl pík guaninu v této koncentraci detekovatelný. Došlo k jeho značnému rozmytí a jeho integrace byla obtížná.

## 6. Závěr

Teoretická část diplomové práce se v první části zabývá popisem fyzikálně-chemických a farmakologických vlastností acikloviru. Jsou zde uvedeny lékopisné požadavky, mechanismus účinku, farmakokinetika a také základní klinické údaje. Pro přehled je na str. 15 přiložena tabulka obsahující léčivé přípravky s obsahem acikloviru registrované v České republice. Dále je stručně popsán také guanin jako degradační produkt acikloviru. Poslední část teorie popisuje vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. Zabývá se jejím principem, základním schématem chromatografického systému, základními separačními módy a různými typy stacionárních fází a detektorů. Zvýšená pozornost je věnována metodě hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) ve spojení se stacionární fází na bázi porézního grafitizovaného uhlíku (PGC), který byl předmětem této práce.

Experimentální část popisuje vliv rozdílného složení mobilních fází na retenční chování i separaci acikloviru a guaninu na koloně Hypercarb<sup>TM</sup>. Organické fáze byly tvořeny acetonitrilem, methanolem a propan-2-olem. Tato rozpouštědla byla použita buď samostatně nebo ve vzájemných kombinacích s různými poměry. Vodné fáze obsahovaly pufovací látky o určité koncentraci (kyselina octová, kyselina trifluoroctová, diethylamin, fluorid amonný, fosforečnany).

Nejprve byl sledován vliv změny poměru vodné a organické složky mobilní fáze s obsahem kyseliny octové nebo trifluoroctové. Přídavek kyseliny trifluoroctové do mobilní fáze obvykle zkrátil retenci acikloviru i guaninu a zlepšil symetrii píků oproti mobilním fázím, ve kterých byla přítomna kyselina octová. Přítomnost methanolu výrazně zvyšovala retenci obou analytů oproti použití samotného acetonitrilu. Propan-2-ol obvykle dobu analýzy zkrátil, avšak při zvyšování jeho podílu v mobilní fázi docházelo v mnoha případech k rozmývání píků, hlavně u guaninu.

Dále byl testován vliv změny molarity fluoridu amonného. Oproti předchozí diplomové práci [2] však nedošlo k žádným významným zjištěním. Symetrie píků ani rozlišení nebyly optimální. V případě diethylaminu docházelo téměř ve všech případech k eluci analytů spolu s mrtvým retenčním časem. Při použití fosforečnanů se píky značně štěpily a vykazovaly nulové rozlišení.

Nejlepší separace byly získány použitím mobilních fází, ve kterých byly obsaženy již zmíněné kyseliny jako pufrů, a jsou uvedeny v kapitole 5.1.4. U těchto separací doba analýzy nepřekračovala 10 minut, symetrie píků se pohybovaly v rozmezí hodnot 0,7-2,0 a rozlišení mezi píky bylo alespoň 2,0. Jako vůbec nejlepší byla shledána separace při složení mobilní fáze 0,1% TFA : MeOH+ISOP 50+50 (75 : 25). Při něm byla následně testována čistota acikloviru, jako substance léčivé látky (viz kapitola 5.5.).

Mechanismus retence na kolonách Hypercarb<sup>TM</sup> souvisí s mnoha faktory a je velmi komplexní, jak již bylo popsáno v kapitole 3.3.4.3. Stejně jako v předchozích studiích, které se zabývaly separací strukturně podobných látek na kolonách Zr-PBD, b-ZrO<sub>2</sub> a Zr-C, bylo i v případě této kolony prokázáno, že při přítomnosti acetonitrilu se závislost retence na jeho koncentraci projevuje typickou křivkou tvaru písmene „U“. Tento jev se u kolony Hypercarb<sup>TM</sup> potvrdil nejen s acetonitrem, ale také při použití jiných výše zmíněných organických složek, kromě samotného methanolu.

## 7. Seznam použitých zkratek

ACI	aciklovir
ACN	acetonitril
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> (syndrom získaného selhání imunity)
BAV	<i>bioavailability</i> (biodostupnost)
CAD	<i>corona-discharge detector</i> (detektor nabitých částic)
CMV	cytomegalovirus
CRL	chemická referenční látka (dle ČL 2017)
CSP	<i>chiral stationary phase</i> (chirální stacionární fáze)
ČL	Český lékopis
DAD	<i>diode-array detector</i> (detektor s diodovým polem)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (deoxyribonukleová kyselina)
EBV	virus <i>Epstein-Barrové</i>
ECD	<i>electrochemical detector</i> (elektrochemický detektor)
ELSD	<i>evaporative light-scattering detector</i> (detektor rozptylu světla)
EtOH	ethanol
FD	<i>fluorescence detector</i> (fluorimetrický detektor)
GUA	guanin
HEPT	<i>the height equivalent to a theoretical plate</i> (výškový ekvivalent teoretického patra)
HILIC	<i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i> (Hydrofilně interakční kapalinová chromatografie)
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> (virus lidské imunitní nedostatečnosti)

HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Vysokoučinná kapalinová chromatografie)
HSV-1	<i>Herpes simplex virus 1</i>
HSV-2	<i>Herpes simplex virus 2</i>
IEC	<i>Ion Exchange Chromatography</i> (Iontově výměnná chromatografie)
ISOP	propan-2-ol (isopropanol)
MeOH	methanol
MS	<i>mass spektrometry</i> (hmotnostní spektrometrie)
NP-HPLC	<i>Normal Phase HPLC</i> (HPLC na normálních fázích)
PGC	<i>porous graphitic carbon</i> (porézní grafitizovaný uhlík)
PREG	<i>the polar retention effect on graphit</i> (efekt polárního zadržování na grafitu)
RAD	<i>radiometric detector</i> (radiometrický detektor)
RID	<i>refractive index detector</i> (refraktometrický detektor)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (ribonukleová kyselina)
RP-HPLC	<i>Reverse Phase HPLC</i> (HPLC na reverzních fázích)
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i> (Molekulová vylučovací chromatografie)
TDM	<i>therapeutic drug monitoring</i> (terapeutické monitorování léčiv)
TFA	kyselina trifluoroctová
THF	tetrahydrofuran
TK	enzym thymidin kináza
UV/VIS	<i>ultra-violet/visible</i> (ultrafialová a viditelná oblast světla)
VZV	virus <i>Varicella zoster</i>
ZIC-HILIC	zwitteriontová kolona na silikagelovém nosiči



## 8. Seznam citované literatury

1. BOUZKOVÁ, L. HILIC separace acikloviru a jeho degradačního produktu. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2016.
2. TEPLÁ, L. HILIC separace acikloviru a jeho degradačního produktu II. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2017.
3. KOLEKTIV AUTORŮ. *Český lékopis 2017*. Praha: Grada Publishing a.s., 2017. ISBN 978-80-271-2531-9
4. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Some antiviral and antineoplastic drugs, and other pharmaceutical agents*. Lyon, France, 2000. ISBN: 978-92-832-1576-9. str. 47-52
5. Státní ústav pro kontrolu léčiv. Souhrn údajů o přípravku ACICLOVIR OLIKLA, 250MG INF PLV SOL 10. [Online]. aktualizováno 14. 2. 2018. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0172775>
6. Microbiology Note. Antiviral Drug – Mode of Action. [Online]. [cit. 15.1. 2021]. Dostupné z: <https://microbiologynote.com/mechanism-of-antiviral-drug/>
7. LÜLLMANN, H.; MOHR, K.; WEHLING, M. *Farmakologie a toxikologie*. překlad 15., zcela přepracované vydání. Praha: Grada Publishing a.s., 2004. ISBN 80-247-0836-1. str.545-548
8. Státní ústav pro kontrolu léčiv. Souhrn údajů o přípravku ZOVIRAX, 200MG TBL NOB 25. [Online]. aktualizováno 23. 12. 2020 Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0237620>
9. Státní ústav pro kontrolu léčiv. Souhrn údajů o přípravku HERPESIN, 200MG TBL NOB 25. [Online]. aktualizováno 13. 10. 2020. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0155940>
10. DrugBank Online. Acyclovir, Detailed Drug and Drug Target Information. [Online] [cit. 23.1. 2021]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00787>

11. Státní ústav pro kontrolu léčiv. Souhrn údajů o přípravku XOROX, 30MG/G OPH UNG 4,5G. [Online] aktualizováno 15. 5. 2019. Dostupné z:  
<https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0236622&tab=info>
12. Státní ústav pro kontrolu léčiv. Souhrn údajů o přípravku ACICLOVIR CORZIL 250MG INJ PLV SOL. [Online] aktualizováno 16. 2. 2017. Dostupné z:  
<https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0232472&tab=info>
13. TAYLOR, M.; GERRIETS, V. Acyclovir. [Online] [cit. 29.1. 2021]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020. Dostupné z:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542180/>
14. DrugBank Online. Guanine. [Online] [cit. 29.1. 2021].  
Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB02377>
15. Státní ústav pro kontrolu léčiv. Souhrn údajů o přípravku ACICLOVIR ACCORD 25MG/ML INF CNC SOL. [Online] aktualizováno 28. 4. 2020. Dostupné z:  
<https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0236936&tab=info>
16. DOBRUCKÁ, K. Polékové poškození ledvin. *Praktické lékařství*, 2014, 10(4). str. 137-142.
17. BRIGGS, Gerald G.; FREEMAN, Roger K. *Drugs in pregnancy and lactation: a reference guide to fetal and neonatal risk*. 10th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2015. ISBN 978-1-4511-9082-3. str. 77–86
18. Státní ústav pro kontrolu léčiv – SUKL, Databáze léků, [Online] [cit. 1. 1. 2021].  
Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>
19. KOVAŘÍKOVÁ, P.; STARIAT, J., Moodle pro výuku 1 Univerzita Karlova. [Online] [cit. 3.2. 2021]. Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze, HPLC – Historie a základní principy.  
Dostupné z: <https://dl1.cuni.cz/course/view.php?id=2904>
20. KLIMEŠ J. a kol. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*, 2. vydání. Hradec Králové: Nucleus, 2015. ISBN 978-80-260-8175-3
21. KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. Hoboken, New Jersey: JOHN WILEY & SONS, Inc. 2007. ISBN 978-0-471-68162-5

22. NOVÁKOVÁ, L.; DOUŠA, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi 1*. Praha: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3
23. DOUŠA, M. HPLC.cz. [Online] [cit. 5.2. 2021]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
24. PERTILE, E. *Instrumental methods of analysis*. Ostrava: VŠB – Technical University of Ostrava, 2017. ISBN 978-80-248-4124-3
25. Waters The Science of what's possible. How Does High Performance Liquid Chromatography Work? [Online] [cit. 7.2. 2021] Dostupné z: [http://www.waters.com/waters/en\\_CZ/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en\\_CZ](http://www.waters.com/waters/en_CZ/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_CZ).
26. KOVAŘÍKOVÁ, P.; STARIAT, J. Moodle pro výuku 1 Univerzita Karlova. [Online] [cit. 3.2. 2021]. Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze, HPLC – Stacionární fáze a separační módy. Dostupné z: <https://dl1.cuni.cz/course/view.php?id=2904>
27. DONGBIN, Y. et al. Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation – efforts for efficient exosome-based theranostics. *Theranostics*, 2020, vol. 10, Issue 8, str. 3691. doi: 10.7150/thno.41580
28. ROSS, P. The Use of Porous Graphitic Carbon in Liquid Chromatography Performance and Polar Retention Effect. Dostupné z: <https://www.era.lib.ed.ac.uk>
29. ACE – Advanced Chromatography Technologies LTD. ACE HILIC Method Development Kit. [Online] [cit. 10.2. 2021] Dostupné z: <http://www.ace-hplc.com/products/product.aspx?id=5115>
30. VŠCHT, Kapalinová chromatografie, kolony – nové trendy. přednáška, slide 21–35. [Online] [cit. 15.2. 2021] Dostupné z: <https://web.vscht.cz/~schulzov/HPLC/4%202019%20HPLC%20%20Kolony%20%E2%80%93%20nov%C3%A9%20trendy.pdf>
31. Thermo Fisher Scientific. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography: Some Aspects of Solvent and Column Selectivity [Online] [cit. 23.2. 2021] Monica Dolci, Thermo Fisher Scientific, Runcorn, Cheshire, UK. Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Technical-Notes/TN-20544-HILIC-Solvent-Column-Selectivity-TN20544-EN.pdf>

32. SeparationScience. HILIC Stationary Phases [Online] [cit. 25.2. 2021]  
Dostupné z: <https://blog.sepscience.com/liquidchromatography/hilic-stationary-phases>
33. DOHNAL, J.; BRUSOVÁ, H. *Moderní přístupy k farmaceutické analýze*. Praha: Farmaceutická fakulta Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, 2010. ISBN 978-80-7305-085-6. str. 64-90
34. KUČERA, R.; KOVAŘÍKOVÁ, P.; KLIVICKÝ M.; KLIMEŠ J. The retention behaviour of polar compounds on zirconia based stationary phases under hydrophilic interaction liquid chromatography conditions. *Journal of Chromatography A*. **2011**, *1218*, str. 6981-6986.
35. Thermo Fisher Scientific Inc. Hypercarb Columns – Applications Notebook. 2009 [Online] [cit. 3.3. 2021] Dostupné z: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/ANGSCHYPERCARB0609-hypercarb\\_appnotebook.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/ANGSCHYPERCARB0609-hypercarb_appnotebook.pdf)
36. Thermo Fisher Scientific Inc. Method Development Guide for Hypercarb. 2007 [Online] [cit. 3.3. 2021] Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Specification-Sheets/TG-20394-Method-Development-Guide-Hypercarb-Columns-TG20394-EN.pdf>
37. Thermo Electron Corporation. Hypercarb™ HPLC Columns Technical Guide.2004 [Online] [cit. 3.3. 2021] Dostupné z: [https://www.pragolab.cz/documents/hypercarb\\_technical.pdf](https://www.pragolab.cz/documents/hypercarb_technical.pdf)
38. ŽIŽKOVSKÝ, V. Studium využitelnosti alternativních přístupů v HPLC analýze. Disertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2004-2008.
39. TÖRNKVIST, A. *Aspects of Porous Graphitic Carbon as Packing Material in Capillary Liquid Chromatography*. Uppsala: Uppsala University Printers, 2003. ISSN 1104-232X. ISBN 91-554-5532-8
40. MARRIOTT, A.S. *Porous graphitic carbon-based metabolomics and development of an alternative biomass-derived carbon stationary phase*. York: University of York, 2013

41. KOVAŘÍKOVÁ, P.; STARIAT, J., Moodle pro výuku 1 Univerzita Karlova. [Online] [cit. 3.2. 2021]. Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze, HPLC – detektory. Dostupné z: <https://dl1.cuni.cz/course/view.php?id=2904>
42. Hitachi. Technical Support: HPLC, HPLC Basic Course, Principle and Feature of Various Detection Methods. Dostupné z: <https://www.hitachi-hightech.com/global/products/science/tech/ana/lc/basic/course7.html>
43. KOVAŘÍKOVÁ, P.; STARIAT, J., Moodle pro výuku 1 Univerzita Karlova. [Online] [cit. 3.2. 2021]. Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze, Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Dostupné z: <https://dl1.cuni.cz/course/view.php?id=2904>
44. Waters The Science of what's possible. The Promise of Small Particles. [Online] [cit. 11.3. 2021]. Dostupné z: [https://www.waters.com/waters/en\\_US/The-Promise-of-Small-Particles/nav.htm?cid=134804750&locale=en\\_US](https://www.waters.com/waters/en_US/The-Promise-of-Small-Particles/nav.htm?cid=134804750&locale=en_US)
45. KLVANOVÁ, N. Porovnání selektivity a retence analytů na dvou HILIC stacionárních fázích. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2015.
46. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, Third Edition. Hoboken, New Jersey: JOHN WILEY & SONS, Inc., 2010. ISBN 978-0-470-16754-0
47. KALAFUT, P.; KUČERA, R.; KLIMEŠ, J. The influence of a carbon layer deposited on a zirconia surface on the retention of polar analytes in an organic rich mobile phase. *Journal of Chromatography A*. **2012**, 1232, str. 242-247.