

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: Dominika Knoblochová

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Petr Kastner, Ph.D.

Název diplomové práce: Vývoj a validace HPLC metody pro stanovení 3-hydroxykynureninu v biologickém materiálu

3-hydroxykynurenin je jedním z metabolitů tryptofanu a je studován zvláště pro svoji oxidačně modulační aktivitu, díky které má schopnost chránit buňky před oxidačním stresem. Je tvořen z kynureninu katalýzou enzymu kynurenin 3-monooxygenasa, jehož aktivita je sledována na Katedře farmakologie a toxikologie. Pro její studování je třeba kvantitativně stanovit 3-hydroxykynurenin v biologické matrici.

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout HPLC metodu pro stanovení 3-hydroxykynureninu v biologickém materiálu s použitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie a následně metodu validovat.

Během vývoje bylo testováno několik mobilních fází s různými hodnotami pH. Výsledná mobilní fáze byla tvořena 100mM kyselinou mravenčí (pH = 2,25) a methanolem (95:5). Byly také zkoušeny různé typy stacionárních fází, z nichž byla nakonec zvolena kolona YMC TRIART PFP s rozměry 15 × 3 mm a rozměrem částic 5 μm. K detekci 3-hydroxykynureninu byl zvolen UV-VIS detektor, na němž byla nastavena vlnová délka 370 nm. Byla optimalizována též teplota separace na výslednou hodnotu 35 °C. Během analýzy byla využívána izokratická eluce, průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,3 ml/min. Nastříkovaný objem byl nastaven na 10 μl a celková doba analýzy trvala 14 minut.

Mezi validační parametry byly vybrány: linearita, přesnost, preciznost, limit kvantifikace, selektivita, stabilita, carry-over a výtěžnost. Všechny validační parametry odpovídaly přijatelným rozmezím kromě parametru stabilita, která ukázala, že 3-hydroxykynurenin je poměrně nestabilní, a proto je třeba si jeho roztoky připravovat vždy v čase potřeby.

Klíčová slova: 3-hydroxykynurenin, tryptofan, HPLC