

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A FARMACEUTICKÉ ANALÝZY



**Vývoj a validace HPLC metody pro stanovení
3-hydroxykynureninu v biologickém materiálu**

Diplomová práce

Dominika Knoblochová

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

Hradec Králové, 2022

Prohlášení

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

V Hradci Králové dne 13.05.2022

Dominika Knoblochová

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému vedoucímu diplomové práce PharmDr. Petru Kastnerovi, Ph.D. za cenné rady, ochotu, trpělivost, vstřícnost a čas, který mi věnoval při vypracování mé diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala také ostatním pracovníkům Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy a to zejména Ing. Danielu Heblíkovi za jeho pomoc a vytváření přátelského pracovního prostředí.

Tato diplomová práce vznikla za podpory projektu SVV 260 547.

Obsah

Seznam obrázků	10
Seznam grafů	10
Seznam tabulek.....	10
Úvod.....	10
Cíl práce	11
1 Teoretická část.....	12
1.1 Tryptofan.....	13
1.1.1 Metabolismus tryptofanu.....	14
1.1.2 3-hydroxykynurenin	17
1.1.3 Fyzikálně chemické vlastnosti tryptofanu a 3-hydroxykynureninu.....	20
1.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie	21
1.2.1 Charakteristika.....	21
1.2.2 Princip.....	21
1.2.3 Instrumentace.....	22
1.2.4 Stacionární fáze	24
1.2.5 Detektory	27
1.2.6 Chromatografické systémy	30
1.2.7 Kvalitativní a kvantitativní analýza.....	34
1.2.8 Úprava vzorku k chromatografické analýze	36
1.2.9 Validace.....	41
2 Experimentální část	46
2.1 Instrumentace, přístroje a pomůcky	47
2.1.1 Instrumentace.....	47
2.1.2 Přístroje.....	47
2.1.3 Ostatní laboratorní pomůcky	48
2.2 Použité chemikálie	48
2.3 Testovaný materiál	48
2.3.1 Příprava standardních roztoků	48
2.3.2 Biologický materiál	49
2.4 Obecné postupy	49
2.4.1 Příprava mobilní fáze.....	49
2.5 Vývoj metody HPLC.....	50
2.5.1 Výběr mobilní fáze	50
2.5.2 Výběr stacionární fáze	52
2.5.3 Změna průtoku mobilní fáze.....	52

2.5.4	Optimalizace teploty	52
2.6	Metoda zpracování vzorků	52
2.6.1	Příprava spikovaných matric	52
2.6.2	Precipitace	53
2.7	Příprava vzorků pro validaci metody	54
2.7.1	Linearita	54
2.7.2	Přesnost	54
2.7.3	Preciznost	55
2.7.4	Selektivita	55
2.7.5	Limit kvantifikace	55
2.7.6	Stabilita	56
2.7.7	Carry-over	56
2.7.8	Výtěžnost	56
3	Výsledky a diskuze	57
3.1	Výběr mobilní fáze	57
3.1.1	Výběr vodné složky	57
3.1.2	Koncentrace mobilní fáze	60
3.1.3	Výběr organické složky	61
3.2	Výběr stacionární fáze	62
3.3	Změna průtoku mobilní fáze	63
3.4	Optimalizace teploty	64
3.5	Parametry vyvinuté metody	64
3.6	Metoda zpracování vzorků	65
3.7	Validace	65
3.7.1	Linearita	66
3.7.2	Přesnost	66
3.7.3	Preciznost	67
3.7.4	Limit kvantifikace	69
3.7.5	Selektivita	70
3.7.6	Stabilita	70
3.7.7	Carry-over	71
3.7.8	Výtěžnost	72
3.7.9	Shrnutí validace	73
	Závěr	74
	Seznam zkratk	75
	Bibliografie	77

Seznam obrázků

Obrázek 1 Zjednodušený metabolismus tryptofanu ⁹ , vlastní zpracování.....	16
Obrázek 2 Schéma kapalinového chromatografu ²² , vlastní zpracování	22
Obrázek 3 Absorbční spektrum 3-hydroxykynureninu, absorbční maximum v 370 nm	57
Obrázek 4 Chromatogramy zobrazující analýzy při různých kombinacích organických složek mobilní fáze	61
Obrázek 5 Zobrazení selektivity, shora dolů biologická matrice, 3-hydroxykynurenin 1000 ng/ml	70
Obrázek 6 Stanovení carry-over, shora dolů biologická matrice s 3-HK 1000 ng/ml, blank tvořený čištěnou vodou.....	72

Seznam grafů

Graf 1 Závislost odezvy na přidavku trifluoroctové kyseliny	59
Graf 2 Závislost retenčního faktoru na výši pH	59
Graf 3 Závislost retenčního faktoru na koncentraci	60
Graf 4 Závislost retenčního faktoru na teplotě	64
Graf 5 Zobrazení kalibrační přímky pro důkaz lineární závislosti	66

Seznam tabulek

Tabulka 1 Studie č. 1 ¹²	18
Tabulka 2 Studie č. 2 ¹³	18
Tabulka 3 Studie č. 3 ⁶	18
Tabulka 4 Studie č. 4 ¹⁴	19
Tabulka 5 Studie č. 5 ¹⁵	19
Tabulka 6 Studie č. 6 ¹⁶	19
Tabulka 7 Fyzikálně chemické vlastnosti tryptofanu.....	20
Tabulka 8 Fyzikálně chemické vlastnosti 3-hydroxykynureninu.....	20
Tabulka 9 Složení placentárního roztoku	49
Tabulka 10 Zkoušené vodné složky mobilní fáze	50
Tabulka 11 Organická složka mobilní fáze	51
Tabulka 12 Zkoušené kolony a jejich charakteristiky	52
Tabulka 13 Množství použitých precipitačních činidel.....	53
Tabulka 14 Příprava spikovaných lidských placentárních homogenátů pro kalibrační řadu	54
Tabulka 15 Příprava roztoků pro stanovení přesnosti	54

Tabulka 16 Příprava roztoků pro stanovení inter-day preciznosti.....	55
Tabulka 17 Příprava roztoků pro stanovení výtěžnosti	56
Tabulka 18 Výsledné parametry zkoušených mobilních fází seřazeny dle pH.....	58
Tabulka 19 Výsledné parametry zkoušených kolon.....	63
Tabulka 20 Výsledné parametry při zvýšení průtoku mobilní fáze	63
Tabulka 21 Parametry vyvinuté metody	65
Tabulka 22 Výtěžnosti při použití precipitačních činidel a relativní směrodatné odchyly měření	65
Tabulka 23 Naměřené hodnoty ploch píků 3-hydroxykynureninu a výpočet odchyly	67
Tabulka 24 Naměřené hodnoty pro určení preciznosti a výsledné průměrné hodnoty a relativní směrodatné odchyly.....	67
Tabulka 25 Výsledky měření a výpočet relativní směrodatné odchyly inter-day preciznosti 3-hydroxykynureninu o koncentraci 100ng/ml	68
Tabulka 26 Výsledky měření a výpočet relativní směrodatné odchyly inter-day preciznosti 3-hydroxykynureninu o koncentraci 1000ng/ml	68
Tabulka 27 Výsledky měření limitu kvantifikace	69
Tabulka 28 Výsledky stanovení stability 3-hydroxykynureninu v autosampleru	70
Tabulka 29 Výsledky stanovení stability 3-hydroxykynureninu při pokojové teplotě a na světle...	71
Tabulka 30 Výsledky stanovení freeze thaw stability 3-hydroxykynureninu	71
Tabulka 31 Výsledky stanovení výtěžnosti 3-hydroxykynureninu a jejich relativní směrodatné odchyly	72
Tabulka 32 Shrnutí validačních parametrů	73

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

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Dominika Knoblochová

Supervisor: PharmDr. Petr Kastner, Ph.D.

Title of thesis: Development and Validation of HPLC Method for Determination of 3-Hydroxykynurenine in Biological Material

3-Hydroxykynurenine is one of the metabolites of tryptophan and is studied especially for its oxidative modulatory activity, which provides the ability to protect cells from oxidative stress. It is formed from kynurenine by catalysis of the enzyme kynurenine monooxygenase, whose activity is monitored at the Department of Pharmacology and Toxicology. It is necessary to quantify 3-hydroxykynurenine in a biological matrix for its study.

The aim of this diploma thesis was to develop an HPLC method for the determination of 3-hydroxykynurenine in biological material using high performance liquid chromatography and subsequent method validation.

During development, several mobile phases with different pH values were tested. The resulting mobile phase consisted of 100 mM formic acid (pH = 2.25) and methanol (95:5). Different types of stationary phases were also tested, from which a YMC TRIART PFP column with dimensions of 15 × 3 mm and a particle size of 5 µm was finally chosen. A UV-VIS detector was selected to detect 3-hydroxykynurenine, on which a wavelength of 370 nm was set. The separation temperature was also optimized to a final value of 35 °C. Isocratic elution was used during the analysis, and the mobile phase flow rate was set at 0.3 ml/min. The injection volume was set at 10 µl and the total analysis time was 14 minutes.

The selected validation parameters were as follows: linearity, accuracy, precision, limit of quantification, selectivity, stability, carry-over and recovery. All validation parameters corresponded to acceptable ranges except for the stability parameter, which showed that the 3-hydroxykynurenine is relatively unstable, and its solutions should always be prepared at the time of use.

Keywords: 3-hydroxykynurenine, tryptophan, HPLC

Úvod

Tato diplomová práce se zaměřuje na vývoj a validaci HPLC metody pro stanovení 3-hydroxykynureninu v biologickém materiálu.

3-hydroxykynurenin je jedním z metabolitů tryptofanu, vzniká přeměnou kynureninu pomocí enzymu kynurenin 3-monooxygenasa (KMO). Přestože 3-hydroxykynurenin vykazuje za určitých podmínek prooxidační účinky, které by mohly poškozovat buňky lidského těla, má také antioxidační vlastnosti a je schopen redoxních modulačních účinků, které by měly riziko poškození buněk spíše snižovat. Na Katedře farmakologie a toxikologie je mimo jiné studována aktivita KMO enzymu, a proto bylo třeba vyvinout metodu, která by byla schopná 3-hydroxykynurenin v biologické matrici stanovit.

3-hydroxykynurenin je podrobněji popsán v teoretické části, která se zabývá také tryptofanem, ze kterého je 3-hydroxykynurenin odvozen. Dále se teoretická část zabývá studiem vysokoúčinné kapalinové chromatografie, která je jednou z nejlepších analytických metod pro analýzu jak endogenních látek, tak léčiv nebo potravin. Mezi její hlavní výhody patří vysoká přesnost a rychlost analýzy, je schopna poskytovat jak kvalitativní, tak kvantitativní výsledky měření.

Experimentální část této práce se zaměřuje na výběr optimálních podmínek pro HPLC analýzu s využitím UV-VIS detekce. Při vývoji metody bylo testováno několik mobilních fází, dále jejich koncentrace, několik typů sorbentů i změna teploty v kolonovém prostoru. Poté byla metoda validována dle oficiálních směrnic a použita pro analýzu 3-hydroxykynureninu v reálném vzorku lidské placenty.

Cíl práce

Cílem této práce je vývoj a optimalizace metody pro stanovení metabolitu tryptofanu 3-hydroxykynureninu s použitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro účely studia enzymové aktivity kynurenin 3-monooxygenasy, enzymu konvertujícího kynurenin na 3-hydroxykynurenin, v prostředí lidské placenty. Stanovení dané sloučeniny bude založeno na spektrofotometrické detekci v UV oblasti absorpčního maxima.

Doprovodným cílem je validace vyvinuté metody, ke které budou využita doporučení FDA a EMA.

1 Teoretická část

1.1 Tryptofan

Sumární vzorec: $C_{11}H_{12}N_2O_2$ ¹

Systematický název: kyselina (S)-2-amino-3-(1H-indol-3-yl)propanová¹

Molekulová hmotnost: 204,23¹

Tryptofan je neutrální aromatická proteinogenní aminokyselina. Patří mezi esenciální aminokyseliny, což znamená, že ho lidské tělo není schopno endogenně syntetizovat, ale musí být přijímán potravou. Byl objeven anglickým chemikem F. Hopkinsem v roce 1901. Kromě toho, že je tryptofan meziproduktem syntézy a přeměny proteinů, se po absorpci transformuje na řadu malých bioaktivních sloučenin, z nichž každá je schopna ovlivnit buněčné metabolické dráhy a fyziologické reakce. Tryptofan a některé jeho metabolity (melatonin, 3-hydroxykynurenin) mohou působit jako antioxidanty, které jsou schopné účinně odstraňovat reaktivní formy kyslíku a zvyšovat odolnost vůči poškození způsobenému volnými radikály.^{2,3}

Tryptofan je na pohled bílý nebo téměř bílý prášek, který je mírně rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu a prakticky nerozpustný v etheru. Tryptofan lze také rozpustit ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů a minerálních kyselin. Jedná se o jedinou aminokyselinu v proteinech obsahující strukturu indolu, bicyklického kruhu tvořeného benzenovou a pyrrolovou skupinou spojeným s α -uhlíkem skupinou $-CH_2$. Přítomnost indolu v chemické struktuře dává této molekule mezi všemi proteinovými aminokyselinami vysoce hydrofobní vlastnosti.^{1,2}

V centrálním nervovém systému je tryptofan substrátem pro produkci melatoninu, hormonu zodpovědného za udržování normálního cirkadiálního rytmu a serotoninu, neurotransmiteru zodpovědného za emoce. Proto může být doplňování tryptofanu užitečné pro zvýšení produkce serotoninu ke zmírnění deprese. Může pomoci zvýšit duševní a emocionální pohodu, podpořit zdravý spánek, toleranci bolesti a řízení hmotnosti. Naopak snížená hladina tryptofanu a zvýšené hladiny jeho škodlivých metabolitů (kynurenin a kyselina chinolinová) v plazmě mohou vést k rozvoji deprese. Dále mohou snížené hladiny tryptofanu v plazmě nebo deficit jeho metabolitu (serotoninu) naznačovat existenci poruch nálad nebo být jednou z příčin depresivních poruch.^{4,5}

1.1.1 Metabolismus tryptofanu

Pro syntézu proteinů se používá méně než 1 % tryptofanu přijatého ve stravě. Zbytek je degradován dekarboxylací, transaminací, hydroxylací nebo oxidací a vede ke vzniku fyziologicky významných sloučenin. Přibližně 80–90 % tryptofanu je metabolizováno na kynurenin tzv. kynureninovou cestou a následnou tvorbou nikotinamidadeninukleotidu (NAD), důležitého enzymového kofaktoru. Během této cesty dochází k narušení indolového kruhu. Zbytek se metabolizuje tzv. methoxyindolovou dráhou, využívá asi 3–10 % tryptofanu a poskytuje neuroaktivní sloučeniny serotonin a melatonin. Tato cesta udržuje indolový kruh nedotčený. Metabolismus tryptofanu je znázorněn schématem na obrázku č. 1.^{2,6}

K degradaci tryptofanu kynureninovou cestou dochází prostřednictvím několika kroků a tato dráha je zahájena aktivací dvou enzymů – indolamin 2,3-dioxygenasa (IDO) a tryptofan 2,3-dioxygenasa (TDO). Poměr koncentrace kynureninu ke koncentraci tryptofanu odráží aktivitu IDO a TDO a je široce používán pro sledování metabolismu tryptofanu. TDO je exprimována výhradně v játrech a je zodpovědná za regulaci sérové homeostázy tryptofanu. Naproti tomu IDO je exprimována v periferních tkáních včetně endokrinního a centrálního nervového systému, placenty, plic, střeva, imunitních buněk a nadvarlete.⁶

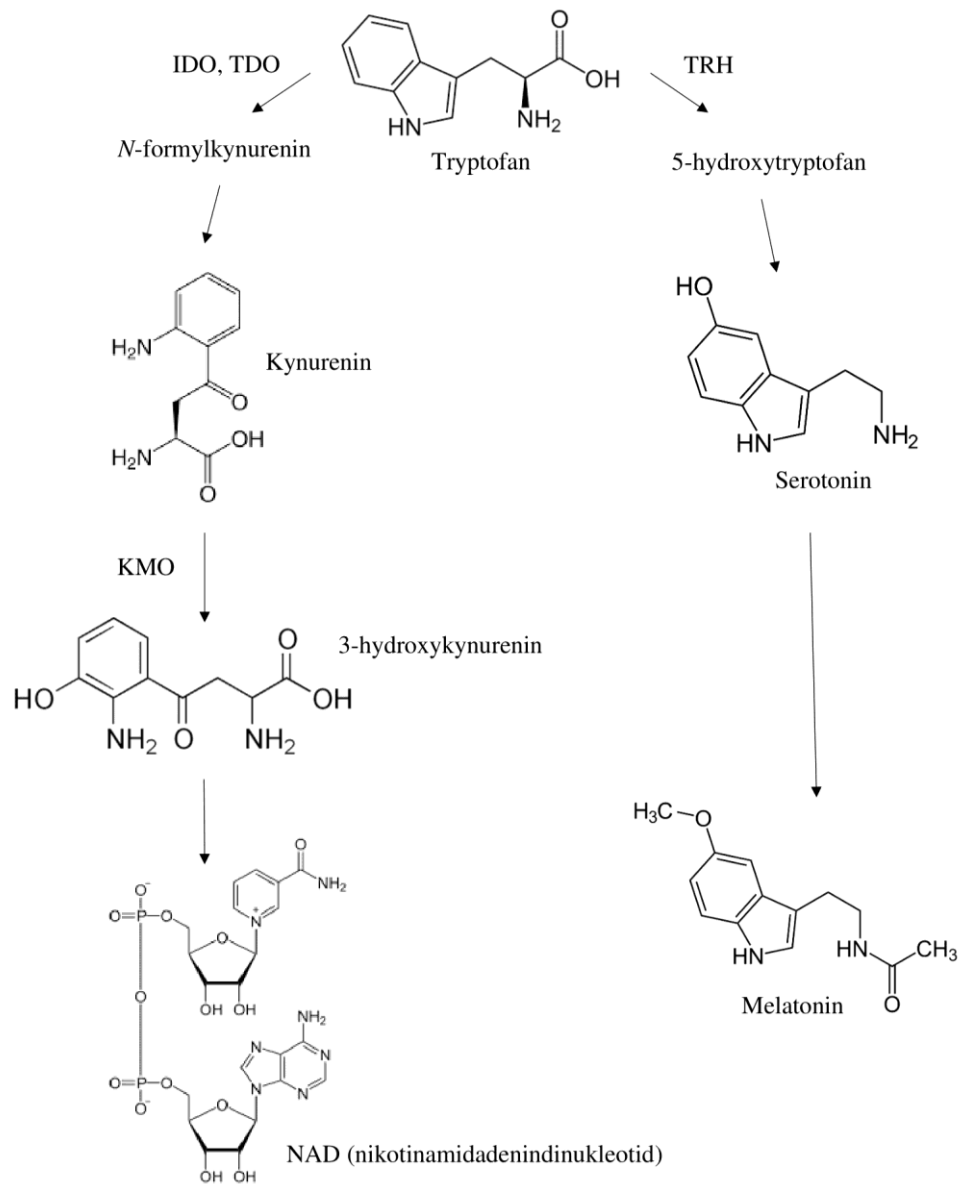
Exprese enzymů je indukována cytokiny, tj. interferonem gamma (IFN- γ), interleukiny (IL-1 α , IL-1 β , IL-6), tumor nekrotizujícím faktorem alfa a lipopolysacharidy spojenými s několika patologickými stavy jako je infekce, rakovina nebo také těhotenství. Oproti tomu antidepresiva, tricyklická nebo selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI), jsou schopny inhibovat TDO a zároveň zvyšují plazmatické hladiny tryptofanu a syntézu serotoninu.^{2,6}

V prvním kroku kynureninové dráhy je tryptofan oxidován IDO nebo TDO na *N'*-formylkynurenin, který je rychle převeden na kynurenin. Ten však může být také prekurzorem pro 3-hydroxykynurenin produkovaný kynurenin 3-monooxygenasou nebo pro kyselinu anthranilovou tvořenou kynureninasou. Následně se kyselina anthranilová přemění na 3-hydroxyanthranilovou kyselinu. Následuje několik dalších kroků k tvorbě kyseliny nikotinové, která je prekurzorem NAD, důležitého enzymového kofaktoru.⁶

Přeměnou tryptofanu methoxyindolovou dráhou dochází k syntéze serotoninu. Děj probíhá ve dvou enzymatických krocích. První spočívá v C-5 hydroxylaci tryptofanu na úrovni benzenového kruhu indolu pomocí tryptofanhydroxylasy vedoucí

k 5-hydroxytryptofanu. Druhým je dekarboxylace 5-hydroxytryptofanu na serotonin, reakce katalyzovaná enzymem L-aminokyselinovou aromatickou dekarboxylasou. Nově syntetizovaný serotonin může vstupovat do zásobních vezikul, aby byl uvolněn jako neurotransmiter v CNS nebo modulátor na periférii. Po jeho uvolnění je přebytek serotoninu opět internalizován prostřednictvím zpětného vychytávání serotoninu. Acetylací serotoninu díky působení transferasy vzniká *N*-acetylserotonin, který se dále konvertuje na melatonin. K syntéze melatoninu může také docházet v periferních tkáních.²

Škodlivé účinky katabolitů tryptofanu (TRYCAT) hrají roli v patofyziologii deprese. TRYCAT jako kynurenin nebo kyselina chinolinová jsou depresogenní a anxiogenní a mají neuroexcitační a neurotoxické účinky, které mohou vést k neurodegeneraci. Dráha TRYCAT je také aktivována po indukci TDO glukokortikoidy, které jsou zvýšené při depresi. Existují důkazy, že aktivace IDO snižuje plazmatický tryptofan a zvyšuje syntézu TRYCAT v depresivních stavech. Bylo prokázáno, že k silné aktivaci kynureninové dráhy a velké akumulaci kyseliny chinolinové v centrálním nervovém systému došlo u několika zánětlivých neurologických poruch jako je epilepsie či Huntingtonova chorea.^{7,8}



Obrázek 1 Zjednodušený metabolismus tryptofanu⁹, vlastní zpracování

1.1.2 3-hydroxykynurenin

3-hydroxykynurenin (3-HK) je metabolitem tryptofanu a je odvozen od kynureninu. Syntéza 3-HK je katalyzována kynurenin 3-monooxygenasou. Jeho *o*-aminofenolová struktura v molekule má zároveň prooxidační a antioxidační aktivitu. S ohledem na prooxidační vlastnosti vědci zjistili, že v některých oblastech mozku může nízká koncentrace 3-HK (1–10 μM) vyvolat tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS). Kromě toho může 3-HK zvýšit aktivitu endogenní xantinoxidasy ovlivněním tvorby peroxidu vodíku (H_2O_2), který poté zhoršuje poškození buněk. Přesný mechanismus, kterým 3-HK v těchto procesech indukuje ROS a generuje H_2O_2 , však není jasný.^{3, 10}

Pro důkaz jeho antioxidační aktivity byl 3-HK v některých studiích navržen jako lapač volných radikálů a antioxidant. Testy pro hodnocení účinnosti vychytávání volných radikálů založené na imunofluorescenční nebo kinetické analýze ukázaly, že 3-HK může vychytávat peroxylové radikály s vysokou účinností. Dokonce ukazují, že reaktivita volných radikálů 3-hydroxykynureninu je stejná nebo i reaktivnější než u vitamínu C nebo vitamínu E, které se používají jako účinné lapače volných radikálů a antioxidanty. Další studie ukazují, že 3-hydroxykynurenin se chová jako antioxidant v mozkové kůře a v gliových buňkách potkanů.^{3, 10}

Celkově tato zjištění naznačují, že přestože 3-HK může za určitých podmínek vykazovat prooxidační účinky, tyto změny slouží k vyvolání redoxní modulační aktivity, která by naopak mohla snížit riziko poškození buněk. Na základě těchto důkazů se 3-HK zdá být spíše redoxní modulační molekulou než neurotoxickým metabolitem.¹¹

Publikované metody pro hodnocení 3-hydroxykynureninu

Tabulka 1 Studie č. 1¹²

Stacionární fáze	Synergi 4 µm fusion-RP80 A
Mobilní fáze	Methanol:10mM dihydrogenfosforečnan sodný (30:70)
Typ eluce	Izokratická
Detektor	UV (220 nm), fluorescenční detekce
Průtoková rychlost (ml/min)	1,4
Doba analýzy (min)	7
Teplota kolonového prostoru (°C)	40
Biologický materiál	Lidská plazma, potkaní sérum a játra

Tabulka 2 Studie č. 2¹³

Stacionární fáze	Restek Ultra Aqueous C18
Mobilní fáze	0,05%; 0,1% mravenecnan amonný; 0,05% acetát amonný + acetonitril (90:10)
Typ eluce	Gradientová
Detektor	MS
Průtoková rychlost (ml/min)	0,4
Doba analýzy (min)	8
Teplota kolonového prostoru (°C)	35
Biologický materiál	Myší mozek, myší sérum

Tabulka 3 Studie č. 3⁶

Stacionární fáze	Kolona C18
Mobilní fáze	50mM CH ₃ COOH, 250mM (CH ₃ COO) ₂ Zn 0,1M CH ₃ COONH ₄ , 1% v/v ACN
Typ eluce	Izokratická
Detektor	UV (365 nm)
Průtoková rychlost (ml/min)	-
Doba analýzy (min)	10
Teplota kolonového prostoru (°C)	25
Biologický materiál	Lidské sérum

Tabulka 4 Studie č. 4¹⁴

Stacionární fáze	HP-Spherisorb RP-18
Mobilní fáze	1% kyselina octová:ethanol (75:25)
Typ eluce	Izokratická
Detektor	UV (254, 280 a 325 nm)
Průtoková rychlost (ml/min)	0,7
Doba analýzy (min)	8
Teplota kolonového prostoru (°C)	22–24
Biologická materiál	Lidská moč, plasma, sérum, mozkomíšní mok

Tabulka 5 Studie č. 5¹⁵

Stacionární fáze	Kolona C8
Mobilní fáze	0,050M octan sodný, acetonitril a methanol v různých poměrech.
Typ eluce	gradientová
Detektor	UV (365 nm) i fluorescenční
Průtoková rychlost (ml/min)	0,8
Doba analýzy (min)	20
Teplota kolonového prostoru (°C)	35
Biologický materiál	Mozkomíšní mok, lidské sérum

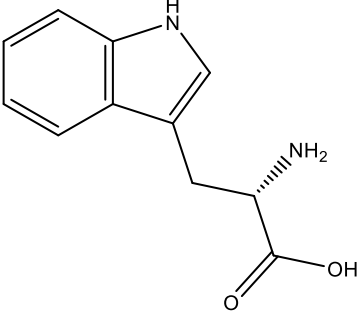
Tabulka 6 Studie č. 6¹⁶

Stacionární fáze	Atlantis dC18 kolona
Mobilní fáze	0,2% kyselina mravenčí:acetonitril
Typ eluce	Gradientová
Detektor	MS
Průtoková rychlost (ml/min)	0,3
Doba analýzy (min)	8
Teplota kolonového prostoru (°C)	25
Biologický materiál	Lidská plazma

1.1.3 Fyzikálně chemické vlastnosti tryptofanu a 3-hydroxykynureninu

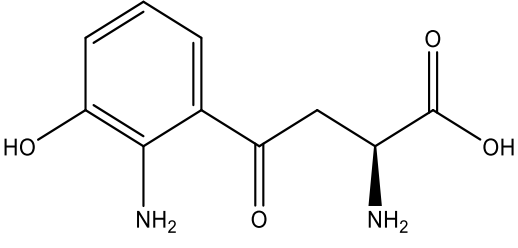
V následujících tabulkách č. 7 a 8 jsou znázorněny fyzikálně-chemické vlastnosti tryptofanu a jeho metabolitu 3-hydroxykynureninu získané z databázi Pubchem, Reaxys a programu Chemdraw.

Tabulka 7 Fyzikálně chemické vlastnosti tryptofanu

Tryptofan	pKa	Log P	M	
	Pubchem	2,36	-1,06	204,22
		9,42		
	Reaxys	2,25	0,948	204,228
		9,31		
	Chemdraw	10,012	0,32	204,23
		2,094		

Zdroj: Pubchem¹⁷, Reaxys¹⁸ a Chemdraw

Tabulka 8 Fyzikálně chemické vlastnosti 3-hydroxykynureninu

3-hydroxykynurenin	pKa	Log P	M	
	Pubchem	-	2,5	224,21
		-		
	Reaxys	-	1,78	224,116
		-		
	Chemdraw	9,349	1,21	224,09
		1,937		
	8,333			

Zdroj: Pubchem¹⁹, Reaxys²⁰ a Chemdraw

1.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

1.2.1 Charakteristika

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, v originálu High Performance Liquid Chromatography (HPLC), patří mezi nejprogresivnější metody analýzy léčiv i biogenních látek. Je využívána pro své přednosti, mezi které patří:

- kvantitativní i kvalitativní analýza látek,
- malé množství vzorku potřebné pro analýzu,
- rychlost analýzy,
- citlivost metody v závislosti na použitém detektoru,
- možnost automatizace (provedení desítek analýz za sebou bez zásahu analytika).²¹

1.2.2 Princip

Kapalinová chromatografie se řadí mezi separační metody. Jejich principem je dělení látek ve směsi pomocí dvou různých nemísitelných fází: fáze mobilní a stacionární. Mobilní (pohyblivou) fází tvoří v kapalinové chromatografii vždy kapalina, stacionární (nepohyblivou) může tvořit pevná látka nebo kapalina nanesená na nosič. K oddělování látek ve směsi dochází postupnou distribucí látky mezi obě fáze, mobilní i stacionární. Jelikož jsou obě fáze vzájemně nemísitelné, existuje mezi nimi fázové rozhraní. Během separace dochází k ustalování rovnováhy mezi fázemi. Tento jev je popsán rozdělovací (distribuční) konstantou, kterou znázorňuje následující vzorec.²²

$$K_D = c_s / c_m$$

K_D distribuční konstanta

c_s koncentrace látky ve stacionární fázi

c_m koncentrace látky v mobilní fázi

Jak vyplývá ze vzorce, látka nejdéle zadržována ve stacionární fázi bude mít největší retenci a bude charakterizována největší hodnotou rozdělovací konstanty. Aby byly látky od sebe odděleny, musí se jejich distribuční konstanty lišit. Je také zřejmé, že oddělování látek ovlivňují vlastnosti obou fází.²²

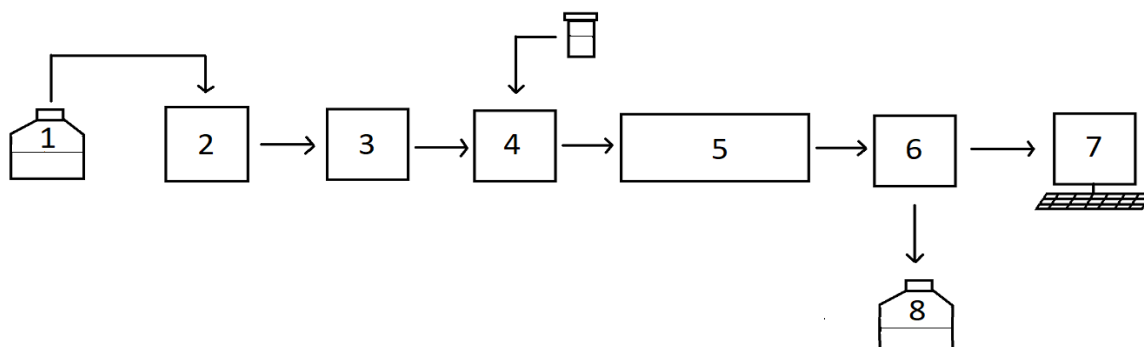
Při použití mobilní fáze s konstantním složením po celou dobu analýzy hovoříme o izokratické eluci. Tato metoda je používána u látek s podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, jejichž časy eluce (retenční časy) se od sebe vzájemně příliš neliší. Druhou používanou metodou je eluce gradientová. Ta nachází uplatnění obzvláště při oddělování látek s odlišnými vlastnostmi, jejichž izokratická separace by byla časově výrazně delší. Při analýze se postupně mění složení mobilní fáze dle naprogramování. Zvyšuje se koncentrace složky, která na látku působí vyšší eluční silou. Díky tomu se látka eluuje s kratším retenčním časem a tím je zajištěno zkrácení času celé analýzy.²²

Separovaná látka vycházející z kolony prochází detektorem, který její fyzikálně-chemické vlastnosti převádí na elektrický signál, jenž lze zaznamenat ve formě chromatogramu. Chromatogram znázorňuje závislost intenzity určité veličiny na čase. Jednotlivé látky jsou na chromatogramu znázorněny typickými píky, které mají gaussovský tvar.²²

1.2.3 Instrumentace

Obecné schéma kapalinového chromatografu

Jednotlivé části se u různých chromatografů mohou lišit, ale základní struktura zůstává zachována. Kapalinový chromatograf je tvořen součástmi zobrazenými na následujícím obrázku č. 2.



Obrázek 2 Schéma kapalinového chromatografu²², vlastní zpracování

Kapalinový chromatograf tvoří:

1. zásobník mobilní fáze,
2. odplynovač (degasser),
3. vysokotlaké čerpadlo,
4. dávkovací ventil,
5. chromatografická kolona v termostatovaném prostoru,
6. detektor,
7. počítač se softwarem,
8. odpad.²²

Nejprve proudí mobilní fáze ze zásobníku do odplynovače, kde nastává odplynění mobilní fáze, aby nedocházelo k zavzdušnění kolony. V případě provádění analýzy s použitím gradientové eluce je mobilní fáze přiváděna ze dvou nebo i více zásobníků. Mobilní fáze je poté vedena do vysokotlakého čerpadla přes dávkovací ventil do chromatografické kolony. Před kolonu je možné zařadit tzv. předkolonu, která slouží jako ochrana kolony před znečištěním. Na kolonu navazuje detektor, z něhož je veden signál do počítače s příslušným softwarem. Mobilní fáze proudí z detektoru do nádoby na odpad.²²

Zásobníkem mobilní fáze je obvykle skleněná nádoba s tmavým sklem pro ochranu mobilní fáze před světlem. Její uzávěr je speciálně upraven tak, aby kapalina mohla odtékat, aby nedocházelo ke znečištění zásoby mobilní fáze z okolí ani k odpařování látky. Ze zásobníku je kapalina nasávána přes filtr pro odstranění případných hrubších nečistot.²²

Odplynovač slouží k odstranění plynu ještě před vstupem do kolony. Plyn rozpuštěný v mobilní fázi se při změně tlaku může uvolňovat a způsobit zhoršení separace. Tím dojde k ovlivnění stability základní linie (baseline) a snížení citlivosti detekce. Také může zhoršit opakovatelnost retenčních časů. K odplynění mobilní fáze se používá vakuový odplynovač. Mobilní fáze proudí polopropustnou kapilárou propustnou pouze pro plyny. Vakuové čerpadlo díky rozdílu tlaku zajistí odplynění. Zásobník mobilní fáze má být umístěn výše, než se nachází čerpadlo, aby došlo k vyrovnání tlaků a snížila se pravděpodobnost zavzdušnění.²²

Čerpadlo slouží k čerpání mobilní fáze ze zásobníku pomocí membrány nebo pístu. Hlavním úkolem čerpadel je zajistit stabilní průtok mobilní fáze a tím naměřit přesné výsledky (např. nižší úroveň šumu, opakovatelné retenční časy).²²

Mezi v současné době používané dávkovače můžeme zařadit manuální smyčkové dávkovače a automatické dávkovače, tzv. autosamplery, jejichž hlavní výhoda spočívá ve zpracování velkého množství vzorků. Vzorky připravené k analýze jsou umístěny v zásobníku vzorků v mikronádobkách zvaných vialky. Vialky mohou být skleněné nebo plastové, průhledné nebo zatmavené, nejčastěji jsou o objemu 2 ml, mají víčko se závitem a pryžové septum pro průchod stříkačky. V případě používání malých objemů vzorků lze do vialky vložit insert umožňující správné dávkování i méně než 100 μl .²²

Kolona má tvar trubice, v jejímž prostoru dochází k vlastnímu oddělení látek ze směsi. Nejvíce se používají kolony o vnitřním průměru 2,1 mm až 5 mm, délce 100 mm až 300 mm a uvnitř s velikostí částic 1 μm až 10 μm . Jsou vyráběny převážně z nerezové oceli, která je velmi odolná. Přesto se při použití určitých mobilních fází mohou uvolňovat ionty železa či jiné ionty. Vnitřní povrch musí odolat vysokým tlakům a chemickému působení proudící mobilní fáze. V případě potřeby se dají použít kolony z tvrzeného skla, které jsou chemicky stabilnější a odolají vyšším tlakům. Kolonový prostor musí být temperován na určitou teplotu, aby nedocházelo k lokálním výkyvům teploty. Teplota má vliv na viskozitu mobilní fáze i na rovnovážné konstanty analytů, proto by při změnách teploty v kolonovém prostoru mohlo dojít k nežádoucímu ovlivnění separace.²²

Pomocí kapiláry je kolona spojena s detektorem. Detektor je schopen zaznamenat rozdíl mezi průchodem čisté mobilní fáze a fáze obohacené o analyt. Detektory lze rozdělit na destrukční a nedestrukční v závislosti na ovlivnění analytu. V destrukčních je pro detekci nutná nevratná chemická přeměna analytu, zatímco v nedestrukčních nikoli. V minulosti nejvíce převažovaly spektrofotometrické detektory. V posledních letech se však stále více využívají detektory s využitím hmotnostní spektrometrie. Použití detektoru záleží na požadavcích analytika, sledovaných parametrech a používaných látkách.²²

1.2.4 Stacionární fáze

Stacionární fáze je jednou z nejdůležitějších součástí chromatografu. Jedná se o náplň kolony, kde dochází k vlastní separaci. Může být tvořena tuhou látkou nebo kapalinou, která je nanášena nebo chemicky navázána na tuhém nosiči. Podle vlastností látek tvořících stacionární fázi je můžeme rozdělit na polární, nepolární a amfoterní stacionární fáze. Dále podle chemického složení na anorganické oxidy, chemicky vázané fáze na silikagelu, polymerní, hybridní a na bázi grafitového uhlíku. Také je můžeme dělit podle módu, který

se při separaci používá: separace na normálních fázích, použití reverzního módu, hydrofobní interakční chromatografie, hydrofilní interakční chromatografie, molekulová vylučovací, iontově-výměnná, afinitní a chirální chromatografie. ²²

Stacionární fáze musí být chemicky a tepelně odolné, nesmí se rozpouštět v mobilní fázi a neměly by s mobilní fází reagovat. Použití nevhodné mobilní fáze nebo příliš vysoké teploty může způsobit vymývání stacionární fáze. To se projeví nižší citlivostí detekce. ²²

Mezi důležité charakteristiky stacionárních fází patří:

- průměrná velikost částic a distribuce velikosti částic (co nejlepších výsledků analýz se dosahuje při co nejmenší distribuci velikosti částic),
- tvar částic (nejlepší účinnosti se dosahuje při pravidelných kulovitých částicích),
- měrný a relativní objem pórů,
- specifický povrch, průměrná hodnota velikosti pórů (pro malé molekuly se používají kolony s co nejmenší velikostí pórů a naopak). ²²

Silikagel

Silikagel má anorganickou strukturu s navázanými polárními skupinami. Je mechanicky velmi odolný, odolá vysokým tlakům. Je také odolný vůči organickým rozpouštědlům, díky čemuž nebobtná ani se nesráží. Povrch silikagelu je tvořen hydroxylovými, v tomto případě silanolovými skupinami (Si-OH). Tyto skupiny mají díky hydroxylům samy o sobě polární charakter. To nachází uplatnění při použití chromatografie na normálních fázích. OH-skupiny jsou také reaktivní a umožňují chemické navázání dalších skupin pro použití při chromatografii na reverzních fázích, při použití hybridní separace nebo hydrofilní chromatografie. ²²

Chemicky vázané fáze na bázi silikagelu

V případě chemické modifikace silikagelového nosiče přibude mnoho výhod. Nedochozí k vymývání stacionární fáze ani k jejímu rozpouštění v mobilní fázi. Také může být nastaven širší rozptyl teplot a složení mobilních fází. Silikagel jako nosič je schopen ovlivnit dynamické vlastnosti analýzy, jako je účinnost kolony a permeabilita. Ty jsou dány velikostí a strukturou částic nosiče. Jeho povrch je poté chemickou reakcí modifikován a vzniká vlastní stacionární fáze. Její fyzikálně-chemické vlastnosti ovlivní retenci a selektivitu analytu. Reverzní fáze na bázi silikagelu patří k nejčastěji používaným sorbentům. ²²

Stacionární fáze na bázi kovových oxidů

Kovové oxidy, stejně jako silikagel, patří mezi polární anorganické sorbenty. Mají však mnohem větší chemickou stabilitu. Vyšší stabilita umožňuje použití mobilní fáze a čištění kolon s agresivnějšími rozpouštědly, provádění analýzy při vysokých teplotách (až do 200 °C) i v celé šíři pH a zajišťuje delší dobu použitelnosti kolony. Mezi nejvíce používané se řadí oxid zirkoničitý, oxid hlinitý a oxid titaničitý.²²

Polymerní stacionární fáze

Polymerní stacionární fáze jsou tvořeny kulovitými částicemi – mikrosférami. Mikrosféry vytvářejí síť, která zajistí porézní strukturu. Jsou stabilní při vysokých teplotách a v celém rozsahu pH, jsou ale omezeny tlakem. Maximální pracovní tlak na koloně může činit 20 MPa. Další nevýhodou polymerních fází je jejich bobtnání při vysokém zastoupení organické složky v mobilní fázi. Mezi nejčastěji používané polymerní fáze se řadí polystyrendivinylbenzen, polyvinyl alkohol a metakryláty. Také se vyrábí stacionární fáze tvořené anorganickým nosičem, na kterém je nanесena vrstva polymeru. Výsledek kombinuje výhody anorganického materiálu (mechanická odolnost) a vlastnosti polymeru (chemickou stabilitu a selektivitu).²²

Hybridní stacionární fáze

Tento typ stacionární fáze se skládá z anorganického silikagelu a organické složky polymeru organosilanu. Povrch takto vzniklého hybridu je dále modifikován pomocí silanů. Tento sorbent využívá výhody silikagelu, kterou je mechanická odolnost a účinnost, a výhody polymeru, jako je chemická a tepelná stabilita. Na struktuře tohoto sorbentu se nachází méně volných silanolových skupin než na pouhém silikagelu. To zajistí u separace bazických látek znatelně větší symetrii píku z důvodu omezení chvostování píků.²²

Stacionární fáze na bázi grafitového uhlíku

Grafitový uhlík je silný adsorbent. Přesný mechanismus retence však není znám. Grafitový uhlík je odolný vůči vysokým teplotám a odolá agresivním mobilním fázím v celém rozmezí pH. Jeho plochá struktura mu umožňuje interakci především s planárními molekulami. Molekuly výrazné prostorové struktury s jeho povrchem mohou interagovat pouze malou částí své molekuly.²²

1.2.5 Detektory

Spektrofotometrické detektory

Mezi v minulosti nejvíce používané se řadí spektrofotometrické detektory. Principem detekce je schopnost látky absorbovat záření o určité vlnové délce v UV nebo viditelné oblasti spektra. Vztahy mezi veličinami popisuje Lambert-Beerův zákon, který je znázorněn následujícím vzorcem.^{22, 23}

$$A = \varepsilon \times c \times l$$

A	absorbance
ε	molární absorpční koeficient
c	koncentrace analytu
l	tloušťka vrstvy

Spektrofotometrické detektory se vyznačují svou citlivostí, jsou schopny zaznamenat koncentraci až 10^{-10} g/ml a dají se použít při gradientové eluci. Lze je rozdělit do čtyř skupin:

- s fixní vlnovou délkou (k vytvoření záření nejčastěji 253,7 nm se používá rtuťová výbojka),
- s měnitelnou vlnovou délkou (na začátku analýzy lze nastavit vlnovou délku vhodnou pro měření analytu, ale pouze z výběru určitých vlnových délek),
- s programovatelnou vlnovou délkou (vlnová délka lze nastavit jakkoli dle potřeby v určitém rozmezí a lze měnit i během analýzy),
- s diodovým polem (detektor je schopen snímat celé spektrum UV-VIS oblasti).^{21, 22}

Fluorescenční detektory

Fluorescenční detektory jsou schopny zaznamenat fluorescenci. Molekula, která přijme záření o určité vlnové délce a následně dokáže záření o nižší vlnové délce vyzářit, je fluorofor (vykazuje fluorescenci). V případě, že analyzovaná látka neobsahuje fluorofory, je možné ji pomocí vhodných činidel derivatizovat a převést ji na fluoreskující derivát. Fluorescenční detektory používají jako zdroj záření rtuťovou výbojku. Jsou citlivější než spektrofotometrické a dokáží zachytit i koncentraci analytu 10 g/ml. Mohou se použít při gradientové eluci, ale jsou méně univerzální. Dají se použít jen u látek vykazujících fluorescenci, popřípadě u látek snadno derivatizovatelných na fluorescenční deriváty.^{21, 22}

Chemiluminiscenční

Chemiluminiscenční detektory, stejně jako fluorescenční, měří fluorescenci. Fluorescence je v tomto případě vyvolána chemickou reakcí. Principem těchto detektorů jsou reakce probíhající v plynné fázi. Z tohoto důvodu nacházejí větší uplatnění v plynové chromatografii. Z hlediska konstrukce jsou jednoduché, neobsahují žádný zdroj záření. Detektor zachytí záření emitované, které vzniklo díky chemické reakci.²²

Elektrochemické detektory

Elektrochemické detektory využívají principu měření elektrické veličiny vyvolané průchodem látky detektorem. Detekují látky, u kterých dochází k redoxním reakcím mezi elektrodou a roztokem (mobilní fáze). Elektrickou veličinou může být elektrický proud nebo elektrodový potenciál. Detektor je schopen určit závislost mezi elektrickou veličinou a koncentrací analytu. Elektrochemické detektory jsou velmi citlivé, stejně jako u detektorů fluorimetrických se však dají použít pouze u úzkého spektra látek (u látek schopných elektrochemických reakcí). Nelze je použít při gradientové eluci.^{21,22}

Vodivostní detektory

Vodivostní detektory jsou schopny měřit elektrickou vodivost mezi dvěma elektrodami. Na obě elektrody je vkládáno střídavé napětí. Velmi důležité je složení mobilní fáze, která musí být nevodivá, aby nedocházelo ke zkreslení měření. Měly by v ní být rozpustné všechny zkoumané látky a musí mít vysokou permitivitu. Jako mobilní fáze s těmito vlastnostmi se používá redestilovaná voda. Ta díky své zanedbatelné vodivosti umožní detekovat i velmi malé množství iontů. Vodivostní detektory nachází největší uplatnění právě v iontové chromatografii.^{21,22}

Univerzální detektory na bázi aerosolu

Tyto detektory dokáží detekovat látku nezávisle na jejích fyzikálně-chemických vlastnostech. Jejich fungování probíhá ve třech fázích. Nejprve dojde k vytvoření aerosolu pomocí proudu dusíku. Následně se aerosol odpaří ve vyhřívané cele. Poté dochází k vlastní detekci. Dle finální fáze detekce rozeznáváme tři typy univerzálních detektorů:

- ELSD – částice vzorku jsou zasaženy laserovým paprskem, tím dojde k rozptylu světla, které je následně změřeno fotonásobičem,

- CAD – díky elektrodě dochází k nabití nosného plynu, který předá kladný náboj aerosolu, poté se odstraní částice nosného plynu a mobilní fáze a je měřen proud vzniklý z náboje částic analytu,
- NQAD – nejprve dojde k odpaření mobilní fáze stejně jako u předchozích typů, poté následuje kondenzace analytu s přesycenou vodní parou, což způsobí vytvoření velkých kapek, ty výrazně zvýší rozptyl světla a zajistí vyšší citlivost detektoru.²²

Hlavními výhodami je schopnost detekovat netěkavé látky a nezávislost na chemických vlastnostech analytu. Hlavní nevýhodou je závislost na složení mobilní fáze, např. větší množství organického rozpouštědla zajistí lepší tvorbu aerosolu, a tím lepší citlivost.²²

Refraktometrické detektory

Refraktometrické detektory využívají pro vyhodnocení měření indexu lomu. Měří rozdíl mezi indexem lomu čisté mobilní fáze a indexu lomu analytu. Mohou být použity u jakékoli látky, jsou zcela univerzální, ale mají řadu nevýhod, kvůli kterým se používají jen sporadicky. Mají menší citlivost až o 3 řády než již zmíněné spektrofotometrické detektory. Jelikož je odezva detektoru závislá na teplotě, musí být detektor termostatován a nelze jej použít při gradientové eluci.^{21, 22}

Hmotnostní detektory

Hmotnostní spektrometry, které se používají jako detektory pro HPLC, jsou finančně náročnější než jiné metody detekce. Jsou schopny poskytnout analytikovi nejen údaje o separaci látek z chromatogramu, ale také údaje pro identifikaci látek. Proces analýzy hmotnostním spektrometrem probíhá ve třech fázích. Nejprve je třeba oddělit vzorek od mobilní fáze a ionizovat ho. Dále dochází k rozdělení iontů dle jejich poměru hmotnosti a náboje. Třetí fází je detekce signálu v detektoru. Mezi ionizační techniky patří ionizace elektrosprejem, chemická ionizace a fotoionizace. Výběr ionizační techniky je ovlivněn těkavostí látky, její polaritou a molekulovou hmotností. Dále dochází k separaci látek dle jejich hmotnosti a náboje pomocí magnetického nebo vysokofrekvenčního pole. Nakonec detektor zaznamená všechny ionty v hmotnostním spektru. Metoda je velmi často používána pro svou vysokou citlivost a schopnost identifikovat a kvantifikovat analyty.^{21, 22}

1.2.6 Chromatografické systémy

Chromatografie na normálních fázích

Systém s normálními fázemi (NP-HPLC) se používal převážně v minulosti zejména v oblasti tenkovrstvé chromatografie. Normal phase (NP) používá pro oddělení látek polární stacionární fázi a mobilní fázi méně polární, než je stacionární fáze. K retenci dělené látky dochází její interakcí s fází stacionární, která je polární. Může být tvořena silikagelem, na jejímž povrchu jsou volné hydroxylové skupiny. Se stacionární fází však zároveň interaguje i mobilní fáze. Proto dochází mezi analyzovanou látkou a mobilní fází ke kompetici o adsorbční místa na stacionární fází. Retence analytu je dána působením sil mezi povrchem stacionární fáze, analytem a sil působících mezi povrchem stacionární a mobilní fáze. V tomto případě, kdy je stacionární fáze tvořena polárními skupinami, se bude nejvíce zdržovat na koloně nejpolárnější analyt. Po přidávání polárnějších rozpouštědel do mobilní fáze se bude analyt na koloně zdržovat čím dál méně.²²

Rozpouštědla mají různou eluční sílu. Při porovnání dvou mobilních fází způsobí jedna z nich rychlejší vymývání analytu z kolony než druhá mobilní fáze důsledkem chemického složení analytu. Tato mobilní fáze má vyšší eluční sílu. Chromatografie na normálních fázích se používá stále méně. Nejvíce se uplatňuje u separací látek, které se v jiných systémech rozpouštějí nebo u látek tukové povahy.²²

Chromatografie na reverzních fázích

Stacionární fáze má nepolární charakter. Je tvořena nosičem, na kterém je ve většině případů navázaný dlouhý uhlíkový řetězec. Obvykle se jedná o silikagel, kovový oxid nebo hybridní sorbent s navázaným C18 řetězcem. Naproti tomu mobilní fáze je polární a používá vodnou složku (voda, kyselina či pufr) v kombinaci s organickým rozpouštědlem mísitelným s vodou (alkoholy, acetonitril). Čím méně je mobilní fáze polární, tím vyšší je její eluční síla. Je to tedy naopak než u módu na normálních fázích. Při separaci na obrácených fázích ovlivňuje retenci převážně složení mobilní fáze. Obvykle je rovnováha ustalována rychleji než na normálních fázích. Chromatografie na reverzních fázích se používá nejčastěji. Je vhodná jak pro separaci jednoduchých molekul, tak pro separaci komplikovaných bílkovin.²²

Iontově výměnná chromatografie

Iontově výměnná chromatografie, v překladu ion exchange chromatography (IEC), využívá principu silných elektrostatických interakcí, které probíhají mezi ionizovanými funkčními skupinami stacionární fáze a proudícím roztokem s opačným nábojem. Nejvíce nachází uplatnění u iontů, popřípadě u snadno ionizovatelných skupin jako jsou proteiny a nukleové kyseliny. Stacionární fáze obsahující iontové skupiny (ionex) může být záporně nabitá (katex) nebo je tvořena kladně nabitými skupinami (anex). U katexů se jedná o kyseliny, které jsou schopny uvolňovat kationty. Katexy lze je ještě dále dělit na silné a slabé. Silné iontoměniče jsou schopny odštěpit ion v celé šíři pH, slabé iontoměniče reagují pouze v neutrálním a bazickém pH. Anexy jsou tvořeny bází uvolňující anionty. Také se dělí na slabé a silné. Slabé anexy protonizují pouze v neutrálním a kyselém pH prostředí. V mobilní fázi se nachází ionty opačného náboje, než je fáze stacionární, a zároveň ionty se stejným nábojem, jaký má analyt. Principem je tedy kompetice iontů analytu a mobilní fáze o ionty navázané na stacionární fázi. Čím více je iontů v mobilní fázi se stejným nábojem, tím rychleji jsou ionty analytů z kolony eluovány.^{22, 23, 24}

Molekulová vylučovací chromatografie

Molekulová vylučovací chromatografie (size exclusion chromatography – SEC) nebo také gelová chromatografie separuje analyty podle jejich velikosti. Využívá k tomu polymerní gel s póry určité velikosti. Při této separaci by nemělo docházet k žádným jiným interakcím mezi látkami. Hlavním mechanismem je pronikání molekul do pórů gelu. Velké molekuly budou eluovány nejdříve, protože kvůli svému uspořádání nedifundují do struktury stacionární fáze. Menší molekuly budou pronikat do gelu v závislosti na své velikosti a uspořádání, z toho důvodu budou z kolony vymývány později. Ty nejmenší molekuly difundují do všech částí gelu, musí urazit nejdelší dráhu, než prostoupí celou kolonou. Právě ty se budou eluovat z kolony jako poslední. Mezi hlavními požadavky na gel používaný při gelové chromatografii jsou:

- inertnost vůči analytům i mobilní fázi,
- odolnost vůči vysoké teplotě a pH,
- mechanická odolnost i při vysokém tlaku.^{22, 24}

Používané gely lze rozdělit na xerogely tvořené organickými makromolekulami, a aerogely, anorganické gely. Dále se dělí na hydrofilní, které se používají pro oddělování látek rozpustných ve vodě, a hydrofobní pro látky rozpustné v organických rozpouštědlech.

Největší nevýhodou gelové chromatografie je malá účinnost separace. Z toho důvodu musí být použity dlouhé kolony, které zapříčiní velmi dlouhou dobu analýzy.^{22,24}

Hydrofilní interakční chromatografie

Chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC) se nejvíce podobá chromatografii na normální fázi. Mechanismus retence je komplexní, zahrnuje více typů interakcí, ale stále není plně objasněn. Stacionární fáze je tvořena silikagelem, který může být modifikován dalšími polárními skupinami. Zachovává si tedy hydrofilní vlastnosti. Mobilní fáze je tvořena nejčastěji acetonitrilem a vodnou složkou. Voda je v tomto případě silné eluční činidlo. V praxi dochází k tomu, že vodná část mobilní fáze vytvoří tenkou vrstvu vody na stacionární fázi. Principem retence je rozdělování mezi hydrofobní částí mobilní fáze a vodou ukotvenou na silikagelu. Se zvyšujícím se podílem vody v mobilní fázi klesá retence analytu. Chromatografie hydrofilních interakcí je vhodnou metodou pro analýzu polárních látek, kterým zajistí dobrou retenci. Tato metoda je také velmi výhodná díky mobilní fázi obsahující výrazné procento acetonitrilu s vysokou těkavostí, čímž umožní propojení s hmotnostní spektrometrií.^{22,24}

Iontově párová chromatografie

Iontově párová chromatografie se nazývá také chromatografie iontových párů. Jejím principem je vytváření iontových asociátů mezi látkou iontové povahy a iontem s opačným nábojem. Ion obsahující opačný náboj má zároveň velmi výraznou nepolární strukturu, příkladem je molekula tenzidu. Vytvořený asociát poté interaguje se stacionární fází typickou pro reverzní fáze. Na rozdíl od chromatografie na reverzních fázích je chromatografie iontových párů schopna ovlivnit separaci látek iontového charakteru, zatímco látky neutrální povahy neovlivní. V porovnání metody reverzní chromatografie a chromatografie iontových párů bude retence následující:

- retence látky, která vytvořila asociát s látkou s opačným nábojem, je vyšší,
- retence látky se stejným nábojem jako ostatní ionty bude nižší,
- u neutrálních látek zůstane retence stejná.

Tato metoda je výhodná pro separaci velmi kyselých a velmi bazických analytů.²²

Hydrofobní interakční chromatografie

Hydrofobní interakční chromatografie (HIC) se používá zejména pro separaci proteinů, jelikož v mobilní fázi neobsahuje organické rozpouštědlo, které by u proteinů

mohlo způsobovat jejich denaturaci. Mobilní fáze je tvořena pouze vodnou složkou a separace analytů je způsobena přidáním organické nebo anorganické soli. Pro separaci proteinů se používá gradientová eluce, při níž dochází ke snižování iontové síly mobilní fáze. Na začátku analýzy obsahuje mobilní fáze velké množství soli a k oddělování analytů dochází postupným snižováním koncentrace soli v mobilní fázi. V případě, že je v mobilní fázi výrazné množství soli, dochází ke snížení solvatace¹ analytu. V mobilní fázi se nachází menší množství volné vody. Díky tomu reaguje analyt více s hydrofobním povrchem stacionární fáze. Dojde ke zvýšení retence. Se snižující se koncentrací soli dochází k větší solvataci analytu. Tím přechází více analytů do mobilní fáze a dále způsobí rychlejší eluci. Retenci látek ovlivňuje kromě koncentrace soli také druh soli. Nejvyšší efekt vykazují fosforečnany a sírany amonné.²²

Chirální chromatografie

Molekuly, které mají stejný sumární a konstituční vzorec lišící se pouze prostorovým uspořádáním, se nazývají enantiomery. Tyto látky mají vzhledem ke své totožné struktuře stejné fyzikálně-chemické vlastnosti. Jejich biologické a farmakologické účinky se ale mohou lišit. U některých léčiv je účinek zajištěn pouze jednou stereoizomerní formou, druhý izomer (zrcadlový obraz) může být méně aktivní, neaktivní nebo může mít nežádoucí účinky. Jelikož mají izomery stejné fyzikálně-chemické vlastnosti, je obtížné je separovat. K separaci se používají dvě metody:

- Nepřímá: nejprve jsou enantiomery derivatizovány pomocí chirálního činidla, tím dojde ke vzniku diastereoizomerů², které již mají různé fyzikálně-chemické vlastnosti. Proto se již dají od sebe oddělit prostou chromatografií.
- Přímá: je vytvořeno chirální prostředí přímo v chromatografickém systému, povrch stacionární fáze může být modifikován za vzniku chirální stacionární fáze nebo je použita achirální stacionární fáze, do mobilní fáze je však přidáno chirální činidlo.

^{22, 24}

Mezi nejčastěji používané chirální stacionární fáze patří sorbenty na bázi celulózy, amyulózy, makrocyclická antibiotika nebo glykoproteiny.^{22, 24}

¹ Snadno vratné spojení rozpouštědla s rozpouštěnou látkou tvořící kolem ní obal – obalení analytu vodou.

² Nejsou si zrcadlovými obrazy, na jednom či více chirálních centrech se mohou lišit.

1.2.7 Kvalitativní a kvantitativní analýza

Kvalitativní analýza

Při kvalitativním hodnocení je základní charakteristikou retenční (eluční) čas. Jedná se o čas od nástřiku vzorku až po dosažení maxima chromatografického píku. Porovnání retenčního času chromatografického píku analytu ve vzorku a retenčního času píku standardu lze považovat za důkaz totožnosti. Další možností potvrzení identity je shodné UV spektrum analytu a standardu. Snímat UV spektrum analyzované látky dokáží jen některé moderní UV detektory. Také lze použít k identifikaci analytu hmotnostní detektor, který navíc popisuje údaje o molekulové hmotnosti. Pro identifikaci lze také porovnat záznam s již vytvořenou knihovnou spekter. ^{21, 25}

Kvantitativní analýza

Kapalinová chromatografie se při kvantitativním hodnocení látek používá velmi často. Mezi hlavní výhody patří vysoká selektivita, citlivost a vyhodnocení v relativně krátké době. Pro vyhodnocení stačí malé množství vzorku a díky automatickému dávkovači je možno celou metodu automatizovat a analyzovat více vzorků bez přítomnosti analytika. Základní kvantitativní charakteristikou je plocha chromatografického píku, eventuálně jeho výška, která se používá jen minimálně a pouze u symetrických a úzkých píků. Při hodnocení se tedy určuje vztah mezi plochou píku a množstvím látky, která se eluuje. Plochy, stejně jako retenční časy, jsou vypočteny pomocí softwaru v počítači. Nejčastější chybou programu je špatná integrace plochy píku. Musí dojít ke správnému určení základní linie a začátku a konce píku. V případě nesprávné integrace ploch počítačem může analytik definovat tvar píku a integrovat ho ručně. Při analýze ploch je nejdůležitější použít stejnou metodu integrace píku standardu jako integrace plochy píku stanovované látky, aby se tyto hodnoty mohly následně porovnávat. Závislost změřených hodnot má relativní charakter. To znamená, že závislost mezi naměřenou hodnotou plochy píku a neznámou koncentrací zkoumaného analytu se stanovuje pomocí porovnání s naměřenými hodnotami standardu o známé koncentraci. ^{21, 25}

Mezi nejčastěji používané metody kvantitativního hodnocení patří:

- metoda vnějšího standardu,
- metoda přídatku standardu,
- metoda vnitřního standardu,

- metoda vnitřní normalizace.

Metoda vnějšího standardu je nejjednodušší metodou, výběr ale záleží na konkrétních podmínkách analýzy.²⁵

Metoda vnějšího standardu

Metoda vnějšího standardu nebo také metoda kalibrační přímky využívá sérii standardů o známých navzájem se lišících koncentracích. Neznámá koncentrace je určena podle zjištěné závislosti známých hodnot. Zjištěná závislost je v ideálním případě lineární. V případě jiné závislosti není dosahováno při výpočtu takové přesnosti. Neznámou koncentraci lze vypočítat za předpokladu, že plocha píků standardu i stanovované látky je přímo úměrná jejich vlastní koncentraci. Metoda vnějšího standardu určí koncentraci stanovované látky porovnáním plochy jejího píku a píku standardu analyzovaného samostatně. Při použití metody kalibrační přímky je třeba použít alespoň 5 kalibračních standardů. Tyto standardy vytvoří kalibrační křivku, pro kterou platí vztah zobrazený následujícím vzorcem.

$$x_i = a + bc_i$$

x_i plocha píku

c_i koncentrace

a posun na ose y

b směrnice přímky

Po dosazení hodnot do vzorce je možno vypočítat neznámou koncentraci analytu.^{24, 25}

Metoda přidavku standardu

Metoda přidavku standardu pracuje na principu porovnávání analytického signálu vzorku a signálu vytvořeného přidáním známých přidavků standardů. Analýza probíhá nejméně ve dvou krocích. Nejprve je analyzováno přesné množství vzorku o neznámé koncentraci. Při druhé analýze je dávkováno přesné množství vzorku, který je obohacený o známý přídavek sledované látky. Tato metoda se používá nejčastěji u látek, u kterých je obtížné získat čistý vzorek bez analyzované látky (např. matrice biologického materiálu), který se používá u předchozí metody k porovnávání. Výsledek je získán porovnáním ploch obou vzorků a dopočítáním neznámé koncentrace.^{24, 25}

Metoda vnitřního standardu

Metoda vnitřního standardu využívá podobného principu jako metoda vnějšího standardu. Rozdíl spočívá v přidavku roztoku vnitřního standardu k roztoku stanovovaného vzorku i k roztoku referenčního standardu. Vnitřní standard je chemická látka s požadovanými vlastnostmi. Látka by měla být nejen eluována v blízkosti stanovované látky, ale také být dobře oddělena od analytu v záznamu, musí být stabilní a v podobné koncentraci jako stanovovaná látka. Také by měla mít podobné fyzikálně-chemické vlastnosti, ale nesmí s analytem interagovat. Tato metoda se používá nejčastěji v případě, že analýze předchází složitější úprava vzorku. Je vhodné přidat vnitřní standard k oběma roztokům na úplném začátku analýzy, dojde tím k eliminaci případných chyb a zvýší se přesnost celého měření.^{24, 25}

Metoda vnitřní normalizace

Při metodě vnitřní normalizace se obsah stanovovaného analytu vyjádří jako procentuální podíl všech píků zobrazených na chromatogramu. Jsou zanedbány píky rozpouštědel a látek pod limitem zanedbatelnosti. Základním nedostatkem této metody je nutnost identifikace všech píků v chromatogramu. Výsledkem je pouze bezrozměrné číslo udávající poměr mezi jednotlivými látkami v roztoku. Tato metoda se využívá u stanovení čistoty látek.^{24, 25}

1.2.8 Úprava vzorku k chromatografické analýze

Při reálné analýze není většina vzorků kompatibilní s chromatografickým systémem, kterým má být analyzována. Vzorky obvykle obsahují množství balastních látek a proteinů, které mohou chromatograf ucpat, znečistit nebo interferovat se sledovanými složkami ve vzorku. Z toho důvodu je nutné vzorek připravený k analýze nejprve upravit; vyčistit, izolovat a zakoncentrovat analyt. Úprava vzorku před analýzou je obvykle nejnáročnějším krokem v celé manipulaci se vzorkem a vysoce ovlivňuje výsledky a přesnost stanovení.²²

Techniky úpravy vzorku můžeme rozdělit do dvou základních skupin. Konvenční metody jsou používány častěji, jsou velmi dobře optimalizovány a jejich používání je ověřeno. Druhou skupinu tvoří moderní trendy v úpravě vzorků. Tyto techniky se snaží úpravu vzorku zjednodušovat, používat menší množství rozpouštědel, snížit spotřebu vzorku, více automatizovat a také zkracovat dobu úpravy vzorku. Moderní metody se mohou

jevit jako pokročilejší, odstraňují určité nedostatky tradičních metod. Některé, jsou ale stále ve vývoji nebo nejsou optimalizovány. V analytických laboratořích se stále používají méně než metody konvenční.²²

Mezi konvenční metody pro úpravu vzorku patří:

- přímá extrakce,
- srážení proteinů,
- extrakce z kapaliny do kapaliny,
- extrakce na tuhou fázi.²²

Přímá extrakce

Při metodě přímé extrakce se extrahuje analyt z tuhé matrice. Důležitým krokem před vlastní extrakcí je úprava vzorku, který je třeba rozmělnit na malé částice. Tento proces zvyšuje účinnost extrakce, protože se zvětší povrch vzorku, čímž je vzorek ve větším kontaktu s rozpouštědlem a zlepší se přenos látky. V praxi se nejčastěji pro extrakci používá horizontálně situovaná třepačka, extrakce na ultrazvukové lázni nebo rotační třepačka. Pro extrakci jsou vybírána polární i nepolární rozpouštědla, vždy záleží na vlastnostech analytu, jako je rozpustnost, rozdělovací koeficient a disociační konstanta. Pro extrakci nepolárních analytů jako jsou lipidy se používají nepolární rozpouštědla, například hexan, chloroform či dichlormethan. Polární analyty jsou extrahovány pomocí polárnějších rozpouštědel, nejčastěji voda v kombinaci s methanolem nebo acetonitrilem. Pro zvýšení rozpustnosti špatně rozpustných kyselých a bazických analytů mohou být použity pufrы. Dále může být rozpustnost látek zvýšena také přidávkem tenzidů.²²

Odstranění proteinů

Výhodou metody odstranění proteinů je její rychlost a jednoduchost. Mezi nevýhody lze zařadit to, že jsou odstraněny pouze proteiny, ostatní nečistoty ve vzorku zůstávají. Proteiny se odstraňují precipitací (srážením), pomocí membránové filtrace či enzymové deproteinace.²²

Při precipitaci je ke srážení proteinů použito precipitační činidlo. Toto činidlo by nemělo ovlivňovat analyt a interferovat při následné detekci. Jako precipitační činidlo může být použito: silná kyselina, silné organické rozpouštědlo, soli vícemocných iontů, kombinace deproteinačních činidel nebo zahřátí na teplotu 100 °C. Po přidání precipitačního činidla se vzorek protřepává. Poté se nechá stočit v centrifuze, aby došlo k oddělení

sražených proteinů od zbytku vzorku. Po odstranění sraženiny je zbylý supernatant přímo odebrán k analýze nebo je odpařen a rozpuštěn v mobilní fázi a následně analyzován.²²

Při membránové filtraci dojde k odstranění proteinů ze vzorku pomocí semipermeabilní membrány. Mezi hlavní výhody této metody patří vysoká účinnost. Nedochází také během filtrace k naředění vzorku, ke změně pH ani jiného narušení analytu způsobené vlivem srážecích činidel. Může však dojít ke ztrátě analytu, který může být částečně navázán na proteinech, které se zfiltrují. Velikost prošlých molekul přes membránu závisí na velikosti póru membrány. Dle velikosti pórů se provádí reverzní osmóza, typ membránové filtrace zachycující molekuly menší než 1 nm. Ultrafiltrace je schopna zachytit proteiny o velikosti 1–10 nm a mikrofiltraci je možné odstranit pouze částice větší než 10 nm.²²

Vzorek lze vyčistit také pomocí proteolytických enzymů. Tato metoda je nazývána enzymová deproteinace. Mezi enzymy používané pro srážení proteinů patří papain, trypsin nebo subtilisin. Enzymy obvykle neinteragují s analytem a jsou šetrné.²²

Extrakce z kapaliny do kapaliny

Extrakce z kapaliny do kapaliny (liquid-liquid extraction, LLE) je velmi často používaná metoda. Její princip spočívá v převedení analytu z vodné fáze, v tomto případě biologického vzorku, do organického rozpouštědla. Metoda je jednoduchá a levná, protože k ní není potřeba žádný specifický přístroj ani vybavení. Jakým způsobem je analyt distribuován mezi obě fáze vyjadřuje rozdělovací koeficient, který je vyjádřen následujícím vzorcem.

$$K_D = c_{org}/c_{voda}$$

K_D rozdělovací koeficient

C_{org} koncentrace analytu v organické fázi

C_{voda} koncentrace analytu ve vodné fázi

Čím vyšší je výsledný rozdělovací koeficient, tím vyšší je účinnost extrakce analytu.

22, 26

U neutrálních látek nezávisí výtěžnost extrakce na pH a díky tomu nemusí být pH roztoku nijak upravováno. U kyselých a bazických analytů však výtěžnost závisí na pH prostředí, protože z vodné fáze do organické dokáže látka přejít pouze v neionizované formě. U kyselých látek musí být pH upraveno směrem do kyselé oblasti a u bazických látek naopak. Díky tomu je zajištěna vyšší efektivita extrakce. Dalším důležitým faktorem je výběr samotného rozpouštědla. Vhodné je zvolit takové rozpouštědlo, ve kterém bude analyt

nejlépe rozpustný. Samotná extrakce probíhá protřepáváním a následnou centrifugací, při níž dojde k oddělení obou nemísitelných vrstev. Organická složka obsahující analyt je oddělena a může být analyzována. Popřípadě ji lze zakoncentrovat odpařením organické složky, následně rozpustit v menším množství mobilní fáze a analyzovat.^{22, 26}

Extrakce na tuhou fázi

Extrakce na tuhou fázi (solid-phase extraction, SPE) je metoda pracující na podobném principu jako vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Principem je navázání analytu na sorbent v extrakční kolonce a vymytí balastních látek z kolonky. Velmi důležité je, aby měl analyt větší afinitu k sorbentu na tuhé fázi než k látkám v matrici. K retenci mohou být využity jak polární, tak nepolární i iontové interakce. Během extrakce jsou používány větší částice a zároveň nižší tlaky, z toho důvodu nemůže metoda dosáhnout takové účinnosti jako HPLC.^{22, 24, 26}

Při extrakci na tuhou fázi je nejprve třeba vybrat správný sorbent. Jsou používány stacionární fáze podobné sorbentům v HPLC jako nepolární fáze (uhlíkový řetězec C18 na silikagelu). Také se využívají polární fáze (silikagel, oxid hlinitý), iontově výměnné stacionární fáze i polymerní sorbenty. Volba správné stacionární fáze záleží na vlastnostech analytu jako je polarita, disociační konstanta, ale také na vlastnostech použitého rozpouštědla. V případě používání nepolárního rozpouštědla je volena polární stacionární fáze a naopak.^{22, 24, 26}

Vlastní separace probíhá v několika krocích:

- kondicionace: cílem je aktivace funkčních skupin sorbentu pomocí organického rozpouštědla, nejčastěji se používá methanol, organické rozpouštědlo je nutno následně vymýt, mohlo by způsobit snížení interakce analytu a sorbentu, také by mohlo způsobit sražení proteinů v matrici, a tím ucpat kolonku,
- nanesení vzorku: v tomto kroku je vzorek nanesen do kolonky, dojde k jeho zachycení na stacionární fázi, zatímco část balastu proteče skrz kolonku ven,
- vymytí balastů: kolonka je promyta vodou či pufrem, aby došlo k odstranění veškerých zbytků matrice,
- eluce analytu: rozpouštědlo (methanol nebo acetonitril) přerušuje vazby analytu se sorbentem a eluát se může poté analyzovat.^{22, 24, 26}

Celý proces probíhá v zařízení zvané manifold, ve kterém je udržován podtlak, což zajistí rychlejší průtok a rychlejší průběh celé extrakce. Tato metoda je používána pro její

rychlost, možnost automatizace a také proto, že je připraven čistý vzorek přímo k analýze.
22, 24, 26

Moderní techniky v úpravě vzorku můžeme rozdělit do tří hlavních skupin:

- mikroextrakce,
- online techniky,
- techniky s vysokou selektivitou. ^{22, 24, 26}

Mikroextrakce

Při mikroextrakčních metodách dochází k výraznému snížení spotřeby vzorku i potřebných rozpouštědel. Mezi metody, které spočívají pouze v miniaturizaci, může být zařazeno DPX (disposable pipette extraction) probíhající ve špičkách pipet. Dále metoda MEPS (micro-extraction by packed sorbent), kdy je sorbent nanesen na vnitřní části stříkačky. U obou těchto metod je princip shodný s SPE, pouze probíhá v mikroměřítku. ^{22, 24, 26}

Další metody řadící se mezi mikroextrakční mají nevýhody bránící jejich širšímu používání. Patří mezi ně dlouhá doba potřebná pro ustalování rovnováhy při extrakci, nutnost opatrného zacházení nebo výběr správných rozpouštědel. Mezi tyto techniky lze zařadit extrakce do jediné kapky rozpouštědla nebo extrakce pomocí dutého vlákna. Tyto metody pracují na principu LLE. Nejvýznamnější je extrakce dutým vláknem využívající vlákno, na němž je nanesen organické rozpouštědlo. Při extrakci interaguje analyt s organickým rozpouštědlem na vlákně a prochází dovnitř, kde se nachází další vrstva organického rozpouštědla. Akceptorová fáze uvnitř vlákna může být přímo analyzována. ^{22, 24, 26}

Online techniky

Hlavním požadavkem u technik pro úpravu vzorku je možnost automatizace. To přináší menší potřebu obsluhy analytikem a úsporu času. Pro propojení techniky úpravy vzorku a HPLC metody se používá tzv. column switching. Jedná se o přepínání kolon během analýzy. Nejprve proudí vzorek na extrakční kolonu, kde dojde k odstranění balastních látek, poté dojde k přepnutí a analyt je nastříknut na druhou kolonu sloužící k analýze vzorku. Mezi techniky automatizace můžeme zařadit chromatografii s turbulentním průtokem nebo použití materiálu s omezeným přístupem. ^{22, 24, 26}

U chromatografie s turbulentním prouděním je separace umožněna díky turbulenci, která zajistí vyšší účinnost separace. K vytvoření turbulence se použije vyšší průtok a vybere

se kolona s většími částicemi. V koloně se vytvoří větší intersticiální prostor, větší částice jsou rychleji unášeny do odpadu, zatímco menší částice snadněji pronikají do sorbentu. Po vyplavení balastů je možno kolonu přepnout a automaticky nastříknout na analytickou kolonu. Použití materiálu s omezeným přístupem je další možností, jak nastříknout vzorek přímo bez předchozí úpravy. RAM (restricted access material) je specifický materiál s upraveným povrchem obsahující póry, do kterých zapadnou pouze částice určité molekulové hmotnosti. Větší struktury jako jsou bílkoviny, nukleové kyseliny a jiný balast, se nezachytí a jsou odvedeny do odpadu. V případě online zapojení lze po odplavení nečistot přepnout kolonu a přímo analyzovat.^{22, 24, 26}

Techniky s vysokou selektivitou

Mezi techniky vyznačující se vysokou selektivitou lze jistě zařadit molekulárně vtištěné polymery. Jedná se o extrakční materiál, který pracuje na principu SPE, zajišťuje ale selektivnější separaci a citlivější analýzu. MIPs (molecular imprinted polymers) jsou schopny rozeznat analyt stericky, dle jeho velikosti a tvaru, dále chemickými interakcemi. V praxi se používají například sorbenty s MIPS pro izolování nesteroidních antiflogistik, beta-blokátorů nebo chloramfenikolu. Výhodou je tedy schopnost připravit si sorbent předurčený pro izolaci určité látky nebo skupiny látek.²²

Další technikou je imunoafinitní SPE. Tato technika využívá princip klasické SPE, kdy je na povrch sorbentu navázána specifická protilátka. Tato metoda může být jediným krokem při úpravě vzorku nebo může být použita v kombinaci s dalšími technikami.²²

1.2.9 Validace

Cílem validace je znázornit a dokázat, že vytvořená metoda je vhodná pro svůj účel. Je to proces, při kterém se určí podmínky zajišťující opakovatelnost a proveditelnost postupu daného měření na různých přístrojích v dalších laboratořích. Během validace se zjišťují hlavní parametry charakterizující danou metodu. Validace se provádí vždy při vývoji nové metody, pokud dochází k úpravě již vytvořené metody nebo při porovnávání dvou metod.^{21, 25}

Existují organizace, které vydávají směrnice, podle nichž lze metody validovat. Směrnice vydávané organizacemi jsou pouze doporučující, tzv. guidelines. Z toho vyplývá, že není nutné se jimi přesně řídit. Přesné parametry se stanoví obvykle podle toho, k jakému

účelu má analytická metoda sloužit, například pouze k identifikaci, stanovení limitního množství nečistot nebo obsahu látky.^{21,25}

Mezi organizace zabývající se validací metod můžeme zařadit The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH), která uvádí jako hlavní validační parametry: selektivitu, linearitu, rozsah, správnost, přesnost, limit detekce, limit kvantifikace, robustnost a systém suitability test. Další organizací je European Medicines Agency (EMA), jejíž hlavní validační pokyny se částečně liší, nezabývají se analýzou léčivých látek a přípravků, ale spíše biologickým materiálem. Mezi validační parametry patří: selektivita, carry-over, limit kvantifikace, kalibrační křivka, přesnost, preciznost, integrita ředění, efekt matrice a stabilita. Dalšími organizacemi, které se zabývají validací metod, jsou Food and Drug Administration (FDA) nebo International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC).^{21, 25, 27, 28, 29, 30}

Přesnost (accuracy)

Přesnost metody vyjadřuje shodu mezi výsledkem měření a přijatou referenční hodnotou. Rozdíl mezi naměřenou hodnotou a přijatou referenční hodnotou se nazývá chyba výsledku. Chyba může být systematická. V takovém případě se jedná o chybu, která je v průběhu měření konstantní nebo se mění předvídatelně. Chyba, která se ale mění nepředvídatelně, je chyba náhodná. Náhodnou chybu odstranit nelze. Rozdíl mezi průměrnou hodnotou výsledků a přijatou referenční hodnotou se nazývá odchylka neboli bias. Odchylka může nabývat kladných i záporných hodnot. Přesnost metody se nejčastěji zjišťuje na třech různých koncentračních úrovních – nejnižší, střední, nejvyšší. Průměr hodnot získaných měření musí být v rozmezí 15 % od referenční hodnoty. Výjimku tvoří koncentrace na spodním limitu kvantifikace, kde může odchylka dosahovat až 20 % od referenční hodnoty.^{25,29}

Preciznost (precision)

Preciznost metody je definována jako míra shody mezi jednotlivými výsledky opakovaně získanými s jedním vzorkem. Preciznost vyjadřuje pouze náhodné chyby měření a neukazuje žádný vztah k přijaté referenční hodnotě. Preciznost je počítána pomocí relativní směrodatné odchylky (RSD) jednotlivých měření. Stejně jako přesnost se parametr stanovuje na třech různých koncentračních hladinách – nejnižší, střední a nejvyšší. Relativní směrodatná odchylka se nesmí lišit o více než 15 % s výjimkou spodního limitu kvantifikace, kde může RSD činit 20 %.^{25,29}

Organizace EMA stanovuje dvě úrovně preciznosti. První je změřena v rámci jednoho měření v jednom dni. Vzorek se nezávisle zanalyzuje kompletním postupem včetně přípravy vzorku. Druhou úroveň popisuje tzv. inter-day precision vyjadřující preciznost výsledků stejného vzorku v různých dnech měření. Organizace ICH uvádí tři úrovně preciznosti. Opakovatelnost (repeatability) znázorňuje těsnost shody výsledků naměřených jedním analytikem na stejném přístroji ve stejný den. Mezilehlá preciznost (intermediate precision) vyjadřuje RSD měření prováděné různými analytiky i různými přístroji v různé dny v rámci jedné laboratoře. Reprodukovatelnost (reproducibility) probíhá na stejném principu jako mezilehlá preciznost, ale v různých laboratořích.^{27, 28}

Selektivita (specificity)

Selektivita metody se definuje jako schopnost metody analyzovat vzorek kvantitativně a kvalitativně i v přítomnosti interferujících látek. Může se jednat o nečistoty z výroby, složky matrice, ale také další účinné látky u složitějších přípravků. Pro prokázání tohoto parametru je třeba doložit výsledek analýzy pouze standardu a výsledek analýzy reálného vzorku bez obsahu analytu (blank). Aby byla metoda selektivní, nesmí se v reálném vzorku biologické matrice nacházet látka, jejíž pík by mohl interferovat s píkem analyzované látky.^{21, 25, 29}

Kalibrační křivka (calibration curve)

Kalibrační křivka nebo také linearita je schopnost metody poskytovat výsledky vykazující lineární závislost mezi koncentrací analyzované látky a odezvou detektoru. V praxi se stanoví alespoň pět kalibračních roztoků různých koncentračních hladin, které se analyzují. Hodnoty získané analýzou se zanesou do grafu. Závislost mezi dvěma veličinami charakterizuje korelační koeficient, který nabývá hodnot blízkých se ± 1 . Čím více se hodnota koeficientu blíží hodnotě 1 nebo (-1) , tím je závislost proměnných těsnější. V některých případech lze využít i nelineární závislosti, které jsou často používány zejména v bioanalytice.^{21, 25, 29}

Rozsah (range)

Rozsah popisuje uzavřený interval koncentrací, ve kterém může být daná metoda používána. Jedná se o validační parametr stanovující rozsah koncentrací, pro které byla validací metody potvrzena dostatečná přesnost a preciznost. Spodní hranici intervalu obvykle tvoří limit kvantifikace, což je také spodní limit linearity. Proto se rozsah často

odvíjí ze studie kalibrační závislosti. Horní hranici intervalu tvoří horní limit kvantifikace. Horní hranice rozsahu může být také stanovena měřením, kdy při překročení přístroj není schopen poskytovat správné výsledky.^{25, 28}

Limit detekce (detection limit) a limit kvantifikace (quantification limit)

Limit detekce je parametr, který vyjadřuje citlivost metody. Jedná se o nejnižší možnou detekovatelnou koncentraci. Limit detekce musí splňovat statisticky významné odlišení signálu od šumu. Při výpočtu musí hodnota plochy píku odpovídat trojnásobku poměru signálu k šumu. Limit kvantifikace také znázorňuje citlivost metody. Je to parametr popisující nejnižší koncentraci, kterou lze stanovit s přesností a precizností. Vyjadřuje se jako desetinásobek poměru signálu k šumu. Hodnota limitu kvantifikace se používá jako nejnižší hodnota tvořící kalibrační přímku. V souvislosti s limitem kvantifikace nutno ještě zmínit i spodní limit kvantifikace (LLOQ) a horní limit kvantifikace (ULOQ), kdy tyto hodnoty udávají rozsah použitelnosti metody. Spodní limit kvantifikace popisuje nejnižší množství analytu, které lze danou metodou stanovit s přesností a precizností a ULOQ udává limit nejvyšší množství analytu, které lze touto metodou hodnotit.^{21, 28, 29}

Kros-kontaminace (carry-over)

Carry-over je parametr, který popisuje přenos zbytkového signálu v po sobě následujících nástřících. V případě kros-kontaminace dojde při analýze k eluci látky, která se však nenachází v analyzovaném vzorku. Nejlepší je tento parametr stanovit již během vývoje metody a minimalizovat ho. Posuzuje se nástřikem slepého vzorku následujícího po vzorku s vysokou koncentrací analytu. Signál slepého roztoku by neměl být vyšší než 20 % hodnoty limitu kvantifikace. V případě, že se nelze přenosu vzorku vyhnout, je třeba zajistit opatření pro zajištění přesnosti a preciznosti metody. Mezi opatření lze zařadit nástřik slepých vzorků vždy po analýze vysokých koncentrací analyzovaných látek.²⁷

Stabilita (stability)

Stabilita analytu i biologické matrice závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech a na skladovacích podmínkách. Hodnocení stability se provádí pro potvrzení stálosti analytu za určitých podmínek v daném časovém období. Výsledná stabilita však vypovídá pouze o konkrétním analytu, obalovém materiálu a specifických podmínkách, při nichž byla stanovena.^{27, 29}

- **Stabilita po zmrazení a rozmrazení (freeze thaw)**

Freeze thaw stabilita popisuje stálost vzorku, který je vystaven opakovanému zmrazování a rozmrazování. Proces je proveden opakovaným zmrazením a samovolným rozmrazením po 12 nebo po 24 hodinách.

- **Krátkodobá teplotní stabilita (short-term)**

Short-term stabilita hodnotí stabilitu vzorku při pokojové teplotě po dobu zpracování vzorku, popřípadě až 24 hodin.

- **Dlouhodobá stabilita (long-term)**

Long-term stabilita napodobuje podmínky uchování vzorku ve zmrazeném stavu až do doby jeho analyzování.

- **Stabilita zásobního roztoku (stock-solution, standard-solution)**

Stock-solution stabilita popisuje stabilitu připraveného zásobního roztoku standardu analyzované látky po dobu 24 hodin.

- **Stabilita po úpravě vzorku (post-preparative, sample-solution)**

Post-preparative stabilita hodnotí stabilitu již připraveného vzorku, který je připraven v autosampleru po dobu trvání analýzy, popřípadě 24 hodin.^{27,29}

Výtěžnost (recovery)

Validační parametr výtěžnost popisuje účinnost extrakčního procesu. Vyjadřuje množství analytu vyextrahované z biologického materiálu. Hodnotí se jako poměr množství analytu získaného extrakční technikou vůči přijaté referenční hodnotě. Výtěžnost metody nemusí být stoprocentní, pro extrakční techniku je důležité, aby byla opakovatelná.²⁹

2 Experimentální část

2.1 Instrumentace, přístroje a pomůcky

2.1.1 Instrumentace

HPLC sestava – Shimadzu Prominence

- HPLC jednotka: Shimadzu, Japonsko,
- řídicí jednotka: CBM-20A,
- degasser: DGU-20A3,
- čerpadlo: LC-20AD,
- autosampler: SIL-20AC,
- termostat kolony: CTO-20AC Shimadzu,
- detektory: UV-VIS SPD-20A,
- chromatografický software: Lab Solutions, version 5.92.

2.1.2 Přístroje

- Spektrofotometr – UV-2401PC Shimadzu, Japonsko,
- analytické váhy – Sartorius A200S, Německo; Mettler AT21 Comparator, Mettler Toledo, Belgie,
- pH metr – SCHOTT CG 843, Schott Instruments GmbH, Německo,
- magnetická míchačka – Color squid, Ika Werke, Německo,
- třepačka – Vortex, VELP Scientifica, Itálie,
- ultrazvuková lázeň – K 10, Kraintek, Slovensko,
- centrifuga – IEC CL31R Multispeed, Thermo electron corporation, USA,
- termostatované zařízení pro odpařování vzorků proudem inertního plynu – TERMOVAP TV – 10 Sample concentrator (Termovap) od Ecom, ČR.

2.1.3 Ostatní laboratorní pomůcky

Digestoř, Eppendorf zkumavky, Erlenmeyerovy baňky, laboratorní lžičky, míchadlo, odměrné válce, pipetík, pipety, špičky, stojan na zkumavky, stříčka, skleněná frita pro odstranění větších nečistot, filtr s velikostí pórů 0,22 μm , skleněné tyčinky, vialky, víčka, septa, zátky (skleněné, plastové), zkumavky.

2.2 Použité chemikálie

- Acetonitril – VWR Chemicals, Francie,
- dihydrogenfosforečnan sodný – Penta s.r.o., Česká republika,
- hydrogenfosforečnan sodný – Sigma Aldrich, Německo,
- hydroxid sodný koncentrovaný RS – ČL 2017,
- 3-hydroxykynurenin – Sigma Aldrich, Německo,
- kyselina chloristá – Penta s.r.o., Česká republika,
- kyselina mravenčí – Sigma Aldrich, Německo,
- kyselina octová 99% – Penta s.r.o., Česká republika,
- kyselina trifluoroctová – Fluorochem, UK,
- methanol – VWR Chemicals, Francie,
- octan amonný – Penta s.r.o., Česká republika,
- voda čištěná reverzní osmózou.

2.3 Testovaný materiál

2.3.1 Příprava standardních roztoků

Zásobní standardní roztok 3-hydroxykynureninu byl připraven navážením 0,15 mg pevného a rozpuštěn v 1,5 ml 50% methanolu (0,1 mg/ml). V čas potřeby byl ze zásobního standardního roztoku připraven naředěním čištěnou vodou roztok 3-hydroxykynureninu. Standard a standardní roztoky byly uchovávány v mrazáku. V případě potřeby byly ze zásobního standardního roztoku připraveny pracovní roztoky o požadované koncentraci 3-hydroxykynureninu zředěním čištěnou vodou. Pro vývoj metody byla připravována

výsledná koncentrace 1 µg/ml. Pro validaci metody byly připravovány další koncentrace 3-hydroxykynureninu: 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml, 500 ng/ml, 600 ng/ml, 800 ng/ml.

2.3.2 Biologický materiál

Jako biologický materiál byly použity homogenáty lidské placenty. Biologické vzorky byly před analýzou uchovány při -80 °C. Lidský placentární homogenát byl připravován na Katedře farmakologie a toxikologie. Odebraná placenta byla nasekána na malé kousky. Takto připravená placenta byla následně homogenizována pomocí teflon-skleněného homogenizátoru v přítomnosti homogenizační směsi. Homogenát placenty byl dále zpracováván pro účely stanovení enzymové aktivity KMO na Katedře farmakologie a toxikologie. Složení homogenátů určených k HPLC analýze je uvedeno v tabulce č. 9.

Tabulka 9 Složení placentárního roztoku

Placenta	Reakční směs:	Homogenizační směs:	Kynurenin 0-8 mM	Kyselina chloristá 6%
	NADPH 1mM	250 mM sacharóza		
	KCl 10mM	50 mM Tris- Hepes		
	EDTA 1mM	5 mM EGTA		
	Tris-HCl pufr 100mM	5 mM EDTA		
		1 mM PMSF		

2.4 Obecné postupy

2.4.1 Příprava mobilní fáze

Každá vodná složka mobilní fáze byla připravena smísením kyseliny či pufru ve vodě čištěné reverzní osmózou. Složení jednotlivých mobilních fází je uvedeno v tabulce č. 10. pH vodné části roztoku bylo změřeno pH metrem a případně upraveno na požadovanou hodnotu pomocí kyseliny octové, hydroxidu sodného koncentrovaného (ČL) nebo kyseliny fosforečné. Následně byly tyto roztoky přefiltrovány přes skleněnou fritu pro odstranění

větších nečistot a dále přes filtr s velikostí pórů 0,22 μm . K přefiltrovanému roztoku se přidal methanol v poměru 95:5. Během analýzy bylo využito izokratické eluce.

Tabulka 10 Zkoušené vodné složky mobilní fáze

MF	Vodná složka	Koncentrace	Aditivum pro úpravu pH	Výsledné pH
1	CH ₃ COOH	100mM	-	2,84
2	HCOOH	100mM	-	2,25
3	CH ₃ COONH ₄	100mM	-	6,90
4	CH ₃ COONH ₄	100mM	CH ₃ COOH (98%)	4,50
5	NaH ₂ PO ₄	100mM	NaOH koncentrovaný (ČL)	7,00
6	Na ₂ HPO ₄	25mM	H ₃ PO ₄	7,01
7	CH ₃ COOH	100mM	NaOH	4,50
8	CF ₃ COOH	0,05%	-	2,08

U mobilní fáze s vyšším obsahem solí hrozí nebezpečí vysrážení po přidání organického rozpouštědla. Proto byly testovány mezní koncentrace pro mobilní fáze s obsahem NaH₂PO₄ a Na₂HPO₄. Při vyšší koncentraci Na₂HPO₄ než 25mM docházelo k zřetelné tvorbě sraženiny v prostředí s více než 75 % methanolu. Vzhledem k obsahu methanolu v mobilní fázi 5 % byla koncentrace 25mM bezpečná, vyšší koncentrace se nepoužívaly.

2.5 Vývoj metody HPLC

K detekci byl použit UV/VIS detektor. Vlnová délka pro detekci zjištěná z literatury činila 365 nm. Vlnová délka byla pro ověření změřena pomocí spektrofotometru – UV-2401PC Shimadzu. Naměřená vlnová délka 370 nm (maximum) byla nastavena na UV detektoru, viz absorpční spektrum v kapitole 3 Výsledky a diskuze.

2.5.1 Výběr mobilní fáze

Pro počáteční screening mobilní fáze byla použita kolona YMC Triart PFP s rozměry 150 × 3 mm a velikostí částic 3 μm .

Jelikož má stanovovaný analyt hydrofilní vlastnosti, bylo pravděpodobné, že se bude eluovat velmi blízko k mrtvému retenčnímu času. Tím hrozila možnost koeluce s polárními látkami, jež jsou přítomny v biologické matrici.

Protože strukturu zkoušené látky tvoří kyselé i bazické funkční skupiny, má charakter amfolytu a tvoří zwitteriont. Testovány byly mobilní fáze s širokým rozsahem pH (2–7), které jsou zobrazeny v tabulce č. 10. Hodnoty pH vodné složky mobilních fází byly vybírány také s ohledem ke stabilitě komerčně dostupných stacionárních fází.

K úpravě pH sloužil především koncentrovaný hydroxid sodný (ČL) nebo kyselina octová, popř. kyselina fosforečná. Z důvodu předpokládané nižší retence 3-hydroxykynureninu se jako organická složka mobilní fáze používal methanol, který má menší eluční sílu než acetonitril. Po výběru vodné složky mobilní fáze se jako organická složka mobilní fáze vyzkoušel také acetonitril.

Optimalizace koncentrace vodné složky mobilní fáze

Koncentrace aditiv v mobilní fázi může také ovlivnit retenční chování analytu. Proto byly vyzkoušeny koncentrace aditiv 10mM, 25mM a 100mM pro vybrané mobilní fáze. Tyto koncentrace byly připraveny nižším vypočteným přídatkem daného aditiva do vody.

Výběr organické složky mobilní fáze

Po výběru vodné složky (100mM kyselina mravenčí) se přistoupilo ke zkoušení organické fáze a sledování jejího ovlivnění vlivu na retenční chování analytu. Kromě 5% methanolu, který se používal pro výběr vodné fáze, se testoval také acetonitril a dále směs acetonitrilu a methanolu v poměru 1:1 (v:v). Všechny zkoušené organické složky a jejich poměry v mobilní fázi jsou uvedeny v následující tabulce č. 11.

Tabulka 11 Organická složka mobilní fáze

Methanol	Acetonitril	Methanol/acetonitril 1:1 (v:v)
3 %	-	-
5 %	2 %	3 %
-	-	5 %
10 %	5 %	8 %

2.5.2 Výběr stacionární fáze

Po výběru optimálního složení mobilní fáze vyvstala potřeba vybrat nejvhodnější stacionární fázi. Během vývoje metody byly vyzkoušeny čtyři různé typy kolon s rozdílnými funkčními skupinami navázanými na silikagelovém nosiči viz tabulka č. 12.

Tabulka 12 Zkoušené kolony a jejich charakteristiky

Typ kolony	Rozměry	Velikost částic	Funkční skupiny
YMC Triart PFP	150 × 3 mm	5 μm	pentafluorfenyl
EVO C18	150 × 3 mm	5 μm	C18
ACE EXCEL 3 C18-AR	100 × 3 mm	3 μm	C18 + fenyl
ACE EXCEL 3 C18-PFP	100 × 3 mm	3 μm	C18 + pentafluorfenyl

2.5.3 Změna průtoku mobilní fáze

Po výběru nejvhodnějšího sorbentu byl testován další parametr, který by mohl ovlivnit výsledky analýzy, a tím byl průtok mobilní fáze. V dosavadních analýzách byl průtok nastaven na 0,3 ml/min. Mimo tuto hodnotu byl vyzkoušen také průtok 0,5 ml/min.

2.5.4 Optimalizace teploty

Po výběru nejvhodnější mobilní a stacionární fáze bylo dále vyzkoušeno ovlivnění separace pomocí změny teploty v kolonovém prostoru. Teplota byla nejprve nastavena na 25 °C. Během vývoje metody byla vyzkoušena také teplota 30 °C, která byla poté zvýšena na 35 °C.

2.6 Metoda zpracování vzorků

2.6.1 Příprava spikovaných matric

Při přípravě spikovaných matric byl použit zásobní standardní roztok 3-hydroxykynureninu, který byl naředěn na požadovanou koncentraci pomocí biologické

matrice. Jako biologická matrice byl použit placentární roztok nebo placentární homogenát získaný z Katedry farmakologie a toxikologie. Při vývoji metody byla koncentrace spiku 1 µg/ml vody. Pro validaci byly výsledné hladiny 3-hydroxykynureninu v matricích 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml, 500 ng/ml, 600 ng/ml, 800 ng/ml a 1000 ng/ml.

2.6.2 Precipitace

Pro svou jednoduchost byla volena precipitace proteinů. Precipitace byla provedena nejprve pomocí silných kyselin (kyseliny chloristé a trifluoroctové) v množství 0,6násobku objemu biologického materiálu. Po protřepání pomocí vortexu, byl centrifugován (10000 otáček/min, 10 minut). V centrifuze došlo k oddělení sražených proteinů od supernatantu, který se následně odebral a mohl být analyzován.

Mimo zmíněných kyselin byl jako precipitační činidlo testován také acetonitril. Pro kvantitativní precipitaci je nutné alespoň trojnásobné množství acetonitrilu vůči celkovému objemu biologické matrice. Velké množství acetonitrilu ve vzorku vzhledem k poměru organického podílu v mobilní fázi, ale může způsobit ovlivnění výsledků (tvar píku) a také zhoršit citlivost vlivem naředěním vzorku. Z tohoto důvodu byl supernatant po centrifugaci odpařen a následně rozpuštěn a naředěn do původního objemu (50 µl) pomocí 5% methanolu.

Množství použitých precipitačních činidel vztažené na 50µl spikované matrice jsou vypsány v následující tabulce č. 13.

Tabulka 13 Množství použitých precipitačních činidel

Precipitační činidlo	Objem činidla vztažený k 50 µl matrice	Násobící koeficient vůči objemu matrice
10% HClO ₄	30 µl	0,6
10% CF ₃ COOH		
acetonitril	150 µl	3

2.7 Příprava vzorků pro validaci metody

Validace je proces, při kterém je ověřeno a prokázáno, že vyvinutá metoda je vhodná k účelu, ke kterému byla vytvořena. Při validaci metody a také při přípravě validačních roztoků se vycházelo ze směrnic.

2.7.1 Linearita

Pro změření kalibrační závislosti byly připraveny roztoky spikované matrice s výslednou koncentrací 3-hydroxykynureninu dle tabulky č. 14.

Tabulka 14 Příprava spikovaných lidských placentárních homogenátů pro kalibrační řadu

Koncentrace pracovního roztoku 3-hydroxykynureninu ($\mu\text{g/ml}$)	Objem pracovního roztoku (μl)	Objem matrice (μl)	Hladina 3-hydroxykynureninu v matrici (ng/ml)
1	5	45	100
1	10	40	200
5	4	46	400
10	3	47	600
10	4	46	800
10	5	45	1000

2.7.2 Přesnost

Přesnost byla sledována na třech koncentračních úrovních, jak je uvedeno v následující tabulce č. 15 – nejnižší (100 ng/ml), střední (500 ng/ml) a nejvyšší (1000 ng/ml). Před HPLC analýzou se ze vzorků pomocí precipitace acetonitrem odstranily interferující proteiny.

Tabulka 15 Příprava roztoků pro stanovení přesnosti

Hladina 3-hydroxykynureninu (ng/ml)	Počet připravených spikovaných vzorků
100	3
500	3
1000	3

2.7.3 Preciznost

Preciznost metody byla testována podobně jako přesnost na třech koncentračních úrovních 3-hydroxykynureninu – 100 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml viz tabulka č. 15.

Inter-day preciznost

Na rozdíl od preciznosti je mezidenní preciznost schopná posoudit, zda metoda poskytuje shodné výsledky v různých dnech měření. Pro stanovení inter-day preciznosti byly připraveny spikované matrice s výslednou koncentrací 3-hydroxykynureninu 100 ng/ml a 1000 ng/ml ve dvou různých dnech. Viz tabulka č. 16.

Tabulka 16 Příprava roztoků pro stanovení inter-day preciznosti

Koncentrace 3-hydroxykynureninu (ng/ml)	Počet připravených spiků v den 1	Počet připravených spiků v den 2
100	3	3
1000	3	3

2.7.4 Selektivita

Pro hodnocení selektivity vyvíjené metody byl připraven standard 3-hydroxykynureninu s nejvyšší (1000 ng/ml) stanovovanou koncentrací a vzorek biologické matrice bez přídavku analytu.

2.7.5 Limit kvantifikace

Jako limitní koncentrace kvantifikace byla zvolena nejnižší koncentrace kalibrační řady – 100 ng/ml. Pro stanovení limitu kvantifikace bylo připraveno šest roztoků spikovaných matic dané koncentrace, které byly připraveny stejným způsobem, jak již bylo popsáno výše.

2.7.6 Stabilita

Pro testování stability byly použity roztoky spikované matrice obsahující koncentraci 500 ng/ml 3-hydroxykynureninu. Stabilita byla testována vždy po 1 vzorku: na světle při pokojové teplotě, v autosampleru při teplotě 5 °C, po 24 hodinách a po 48 hodinách. Dále se testovala tzv. freeze thaw stabilita (zmrazení 2krát za sebou).

2.7.7 Carry-over

Pro stanovení carry-over se připravila spikovaná matrice s nejvyšší stanovovanou koncentrací 3-hydroxykynureninu (1000 ng/ml). Po HPLC analýze tohoto vzorku byl analyzován blank tvořen čištěnou vodou.

2.7.8 Výtěžnost

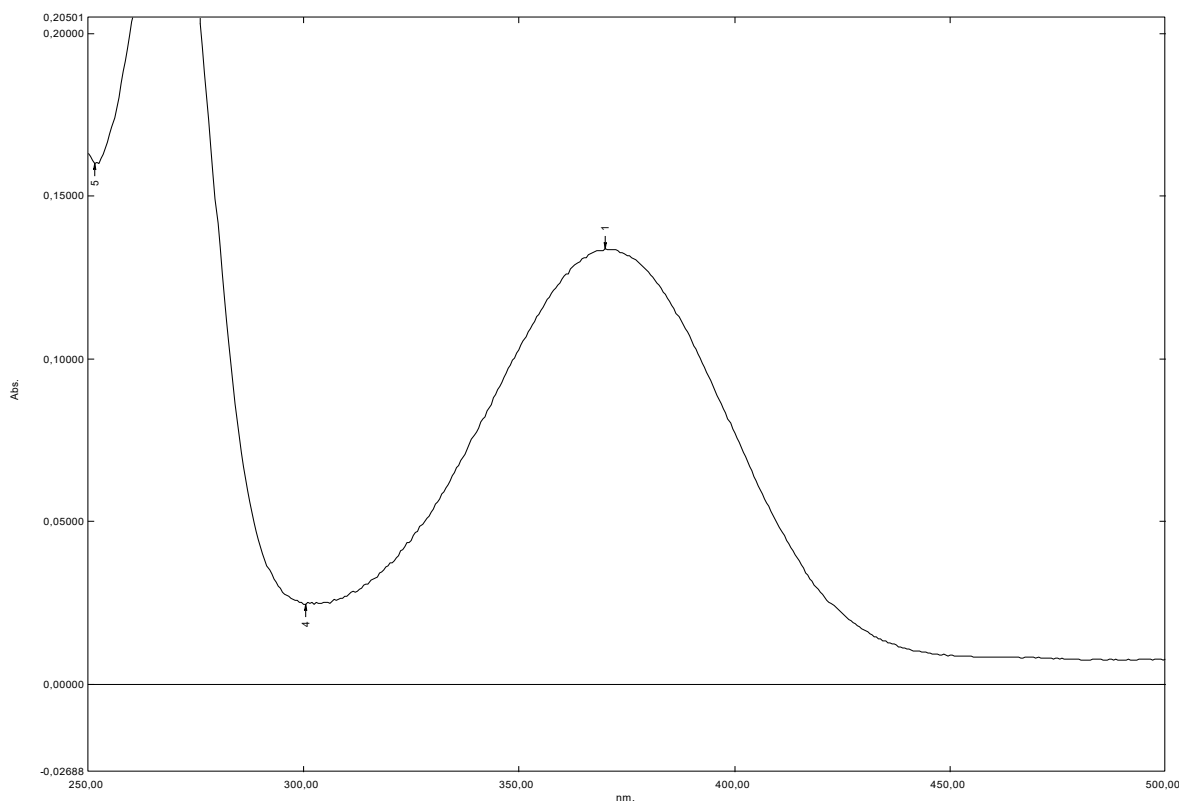
Stanovení recovery neboli výtěžnosti bylo prováděno na třech koncentračních hladinách 3-hydroxykynureninu 100 ng/ml, 500 ng/ml a 1000 ng/ml. Od každé koncentrační hladiny byly připraveny tři roztoky spikované matrice. První sada vzorků všech tří koncentračních hladin byla spikována před precipitací. Druhá sada vzorků zahrnující všechny koncentrace byla spikována po precipitaci. Jednotlivé připravené spiky a jejich koncentrace jsou zobrazeny v tabulce č. 17.

Tabulka 17 Příprava roztoků pro stanovení výtěžnosti

Koncentrace 3-hydroxykynureninu (ng/ml)	Spikováno před precipitací	Spikováno po precipitaci
100	3	3
500	3	3
1000	3	3

3 Výsledky a diskuze

Před vývojem metody bylo změřeno absorpční spektrum 3-hydroxykynureninu za použití spektrofotometru – UV-2401PC Shimadzu. Na obrázku č. 3 je znázorněné změřené absorpční spektrum 3-hydroxykynureninu v UV-VIS oblasti. Analyt vykazuje absorpční maximum při vlnové délce 370 nm, tato vlnová délka byla použita pro HPLC měření a je v soulasu s údajem z literatury (365 nm).⁶



Obrázek 3 Absorbční spektrum 3-hydroxykynureninu, absorpční maximum v 370 nm

3.1 Výběr mobilní fáze

3.1.1 Výběr vodné složky

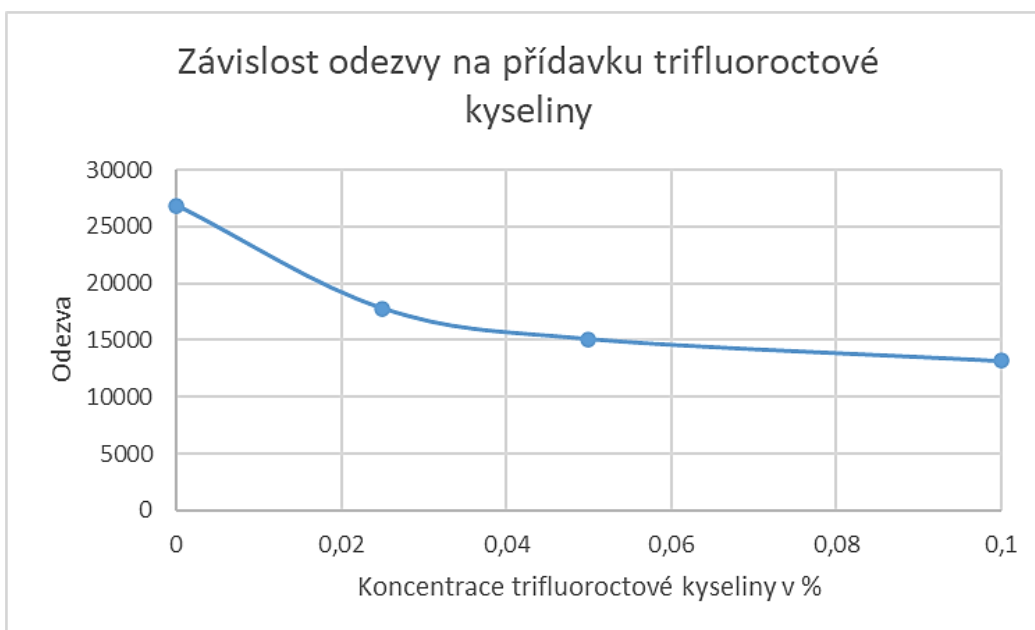
První dvě zkoušené mobilní fáze, kyselina octová a kyselina mravenčí, poskytovaly poměrně dlouhý retenční čas dosahující 10 minut. Poté byly vyzkoušeny mobilní fáze s vyšším pH, u kterých však došlo k výraznému zkrácení retenčního času. U mobilní fáze obsahující octan amonný (pH = 6,9) se navíc objevil výrazný tailing píku 3-hydroxykynureninu. Další testovanou mobilní fází byl acetátový pufr s pH 4,5 ve dvou

variantách. V prvním případě byla požadovaná hodnota pH dosažena pomocí koncentrovaného hydroxidu sodného (ČL), v druhém pomocí octanu amonného. Při úpravě pH pomocí octanu amonného by pozorován vyšší faktor symetrie, který dosahoval 1,4. Mobilní fáze obsahující kyselinu trifluoroctovou byla vyzkoušena kvůli své síle umožňující dosáhnout nízkého pH a vlastnostem iontově párového činidla. Při použití této mobilní fáze se pík 3-hydroxykynureninu eluoval až ve 13. minutě a byl téměř symetrický. Retenční časy, faktory i tailing faktory z jednotlivých měření jsou zobrazeny v následující tabulce č. 18.

Tabulka 18 Výsledné parametry zkoušených mobilních fází seřazený dle pH

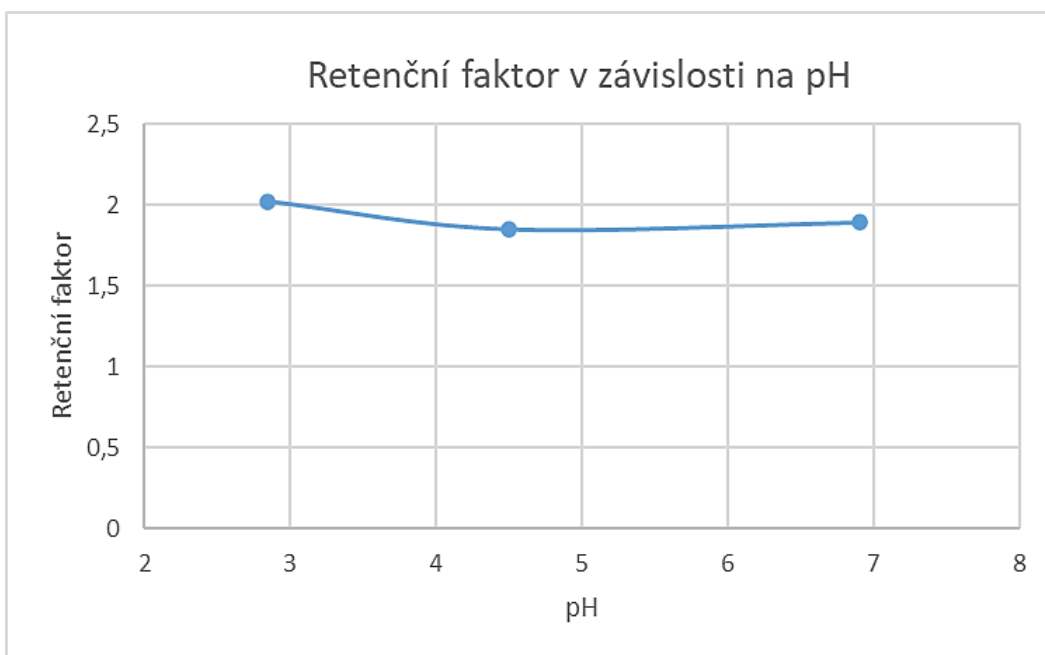
Mobilní fáze + 5% methanol	pH	Retenční čas (minuty)	Retenční faktor	Tailing faktor
CF ₃ COOH	2,08	13	3,37	1,08
HCOOH	2,25	9,4	2,25	1,17
CH ₃ COOH	2,84	10,2	2,02	1,21
CH ₃ COOH + NaOH	4,50	7,5	1,87	1,15
CH ₃ COONH ₄ + CH ₃ COOH	4,50	8,5	1,85	1,39
CH ₃ COONH ₄	6,90	7,5	1,89	1,46
NaH ₂ PO ₄ + NaOH	7,00	7,3	1,80	1,25
Na ₂ HPO ₄ + H ₃ PO ₄	7,01	7,0	1,70	1,21

Při použití kyseliny trifluoroctové však došlo k poklesu UV odezvy o 20 %. Graf č. 1 popisuje pokles odezvy způsobený přidavkem kyseliny trifluoroctové. Čím větší procentuální obsah kyseliny mobilní fáze obsahovala, tím nižší poskytoval 3-hydroxykynurenin odezvu. Pravděpodobný mechanismus snížení odezvy bude právě tvorba iontového páru, který by mohl mít vliv na absorpci stanovovaného analytu.



Graf 1 Závislost odezvy na přidavku trifluoroctové kyseliny

Při použití mobilních fází, které obsahovaly octanový anion (CH_3COO^-): kyselina octová, acetátový pufr a octan amonný, byl mechanismus retence konzistentní. Jednotlivé mobilní fáze mohou být porovnávány na základě pH. Z následujícího grafu je patrné, že při nízkém pH je retence vyšší, ale mezi hodnotami pH 4,5 a 6 již není žádný výrazný rozdíl. Na grafu č. 2 je zobrazena závislost retenčního faktoru, který poskytovaly mobilní fáze obsahující octanový anion, na výši pH.

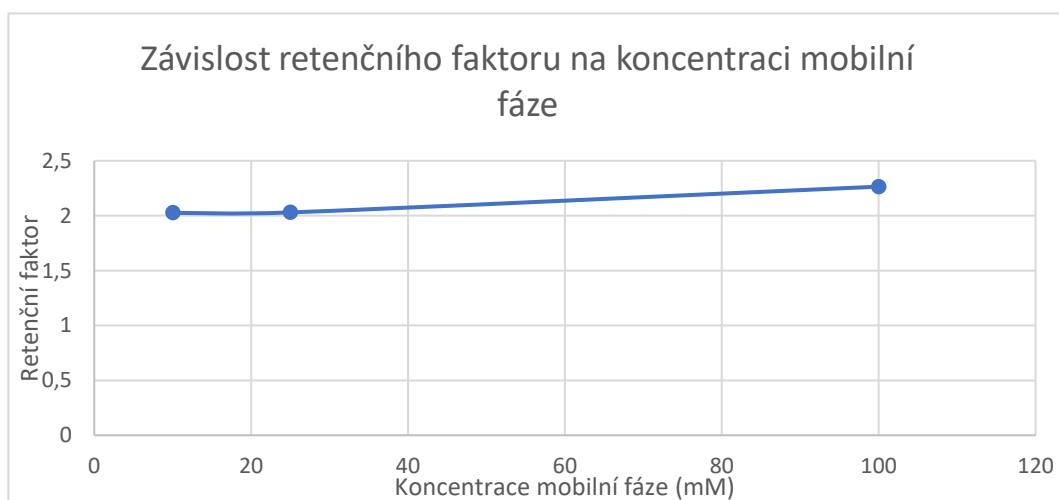


Graf 2 Závislost retenčního faktoru na výši pH

Retenční faktory polárního 3-hydroxykynureninu v prostředí reverzní fáze byly podle očekávání poměrně nízké u všech osmi zkoušených mobilních fází. Nejvyšší retenční faktor vykazuje, a tedy i nejlépe vychází, mobilní fáze s kyselinou trifluoroctovou, která ale z důvodu nižší odezvy nebyla dále používána. Druhý nejlepší retenční faktor vykazuje kyselina mravenčí s retenčním časem 3-hydroxykynureninu činícím 9,4 minut, to z této mobilní fáze činí kandidáta na nejvhodnější.

3.1.2 Koncentrace mobilní fáze

V další fázi vývoje metody byla optimalizována koncentrace aditiv (kyseliny mravenčí) v mobilní fázi. Testovány byly mimo 100mM koncentrace i 25mM a 10mM. V následujícím grafu č. 3 je znázorněno, že změna koncentrace nemá na retenci 3-hydroxykynureninu významný vliv.

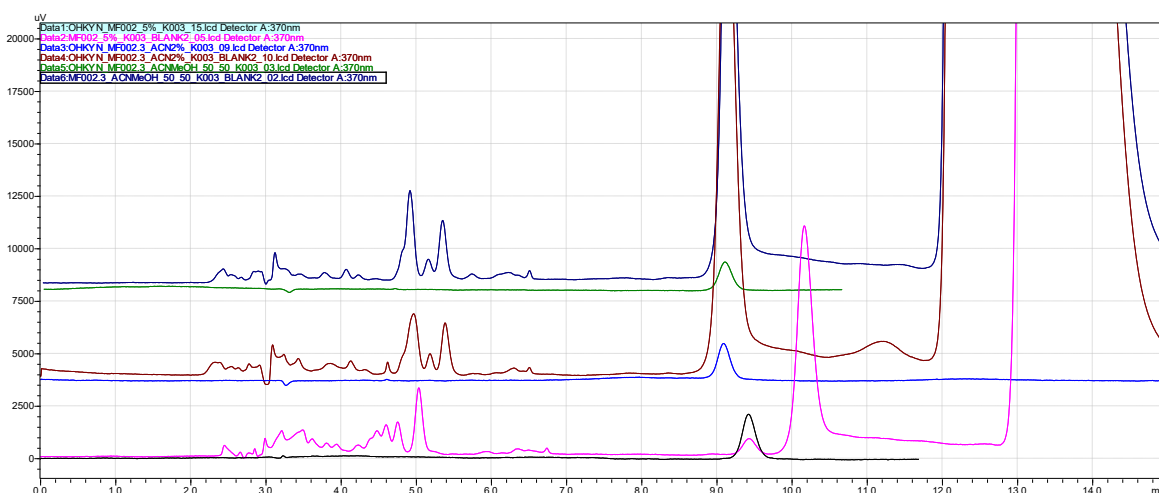


Graf 3 Závislost retenčního faktoru na koncentraci

Koncentrace mobilní fáze však měla vliv na selektivitu analýzy spikovaných matic. Při použití nižších koncentrací kyseliny mravenčí v mobilní fázi docházelo ke koeluci s neidentifikovanou složkou matrice, protože docházelo k posunu retenčního času analytu v reálném vzorku oproti analytu ve standardu. Mohlo dojít k ovlivnění analytu médii, která se nacházela ve složení reálného vzorku. Proto byla zvolena pro další vývoj metody koncentrace kyseliny mravenčí 100mM, při které byla selektivita analýzy dostatečná.

3.1.3 Výběr organické složky

Při vývoji metody bylo třeba také zvolit správné složení a koncentraci organické složky mobilní fáze. Při výběru vodné složky byl použit 5% methanol, který má dle literatury velmi podobnou eluční sílu jako 2% acetonitril i 3% směs acetonitrilu s methanolem v poměru (50:50, v:v). Dále byly testovány přídavky: methanol o koncentraci 3 %, 10 %, acetonitril o koncentraci 5 %, směs methanolu s acetonitrilem v poměru 50:50 o koncentracích 5 % a 8 %. Mobilní fáze s vyšším obsahem organické složky zlepšuje tvar píku, ale zkracuje retenční čas analytu. Všechny koncentrace organických složek byly dále vyzkoušeny s reálnými vzorky obsahujícími biologickou matici. Dle těchto analýz byl vybrán 5% methanol jako nejlepší možná kombinace koncentrace a složení. U vyšší koncentrace methanolu a v případě všech koncentrací acetonitrilu docházelo ke koeluci se složkami biologické matrice. Při nižší koncentraci methanolu se výrazně zhoršil tvar píku. Výsledky jednotlivých analýz jsou zobrazeny na obrázku č. 4.³¹



Obrázek 4 Chromatogramy zobrazující analýzy při různých kombinacích organických složek mobilní fáze

Chromatogramy na obrázku č. 4 zobrazují analýzy při různých kombinacích organických složek mobilní fáze, odshora pík standardu a biologické matrice v prostředí 3% methanol:acetonitril (50:50, v:v), pík standardu a biologické matrice v prostředí 2% acetonitrilu, pík standardu a biologické matrice v prostředí 5% methanolu.

3.2 Výběr stacionární fáze

V další fázi vývoje metody byl vybírán typ stacionární fáze. Během výběru mobilní fáze byla používaná kolona YMC Triart PFP, která umožňuje hydrofobní, π - π a dipól-dipól interakce. Tato stacionární fáze je tedy vhodná i pro látky polárnějšího charakteru.

Dále byla zkoušena kolona Kinetex 5 μ m EVO C18, která je tvořena částicemi obsahující pevné jádro a porézní obal. Při jejím použití dochází k retenci pouze na základě hydrofobních interakcí, proto se 3-hydroxykynurenin eluoval z kolony ve velmi krátkém čase.

Další zkoušená kolona, ACE EXCEL 3 C18-AR obsahuje spolu s C18 dále navázanou fenylovou skupinu, díky níž zajišťuje možnost π - π interakcí s látkami obsahujícími aromatické jádro. Tato kolona je charakterizována nižším mrtvým objemem. Při porovnání retenčního faktoru však není vhodnější než první zkoušená kolona.

Jako čtvrtá stacionární fáze byla vyzkoušena kolona ACE EXCEL C18-PFP, která kombinuje retenční mechanismy obou zmíněných C18 a PFP stacionárních fází. Nicméně ani tato kolona není vhodná. 3-hydroxykynurenin se eluoval brzy, což je patrné z retenčního faktoru 1,69. Z vyzkoušených stacionárních fází je optimální kolona YMC Triant PFP, protože 3-hydroxykynurenin dosahoval nejpozdější retence hodnocené retenčním faktorem 2,25. Zkoušené stacionární fáze jsou zobrazeny v následující tabulce č. 19 a seřazeny dle retenčního faktoru 3-hydroxykynureninu.^{32, 33, 34, 35, 36}

Vhodnost kolon byla dále posuzována dle jejich účinnosti. Účinnost kolony lze vyjádřit jako počet teoretických pater N . Tato veličina má vliv na separaci jednotlivých látek (čím větší počet pater, tím užší pík). Výpočet počtu teoretických pater je zobrazen následujícím vzorcem.³⁷

$$N = 16 \times (t_R/W_b)^2 = 5,54 \times (t_R/W_{h/2})^2$$

t_R retenční čas analytu

W_b šířka píku na základní linii

$W_{h/2}$ šířka píku v polovině

Pro vzájemné porovnání účinnosti kolon lze použít výškový ekvivalent teoretického patra H (čím menší ekvivalent, tím vyšší účinnost kolony). Tento parametr umožňuje porovnávat účinnost kolon s různou délkou, jeho výpočet je zobrazen na následujícím vzorci:

$$H = L/N$$

L délka kolony

N počet teoretických pater.³⁷

Vypočítané počty teoretických pater (N) a jejich výškové ekvivalenty (H) pro každou testovanou kolonu jsou uvedeny v tabulce č. 19.

Tabulka 19 Výsledné parametry zkoušených kolon

Typ kolony	Retenční čas	Retenční faktor	Výškový ekvivalent teoretického patra H	Počet teoretických pater N
YMC Triart PFP	9,4 minut	2,25	0,012	12048
ACE EXCEL 3 C18-PFP	5,4 minut	1,69	0,009	10599
ACE EXCEL 3 C18-AR	4,4 minut	1,30	0,009	11255
Kinetex 5 μ m EVO C18	3,2 minut	0,46	0,020	7339

I přesto, že kolona YMC Triart PFP nevykazuje nejvyšší hodnoty separační účinnosti, byla zvolena z důvodu nejvyšší retence 3-hydroxykynureninu.

3.3 Změna průtoku mobilní fáze

Výsledná změna účinnosti kolony je znázorněna v následující tabulce č. 20. Z dat vyplývá, že při zvýšení průtoku došlo ke snížení účinnosti. Proto byl dále používán průtok mobilní fáze 0,3 ml/min.

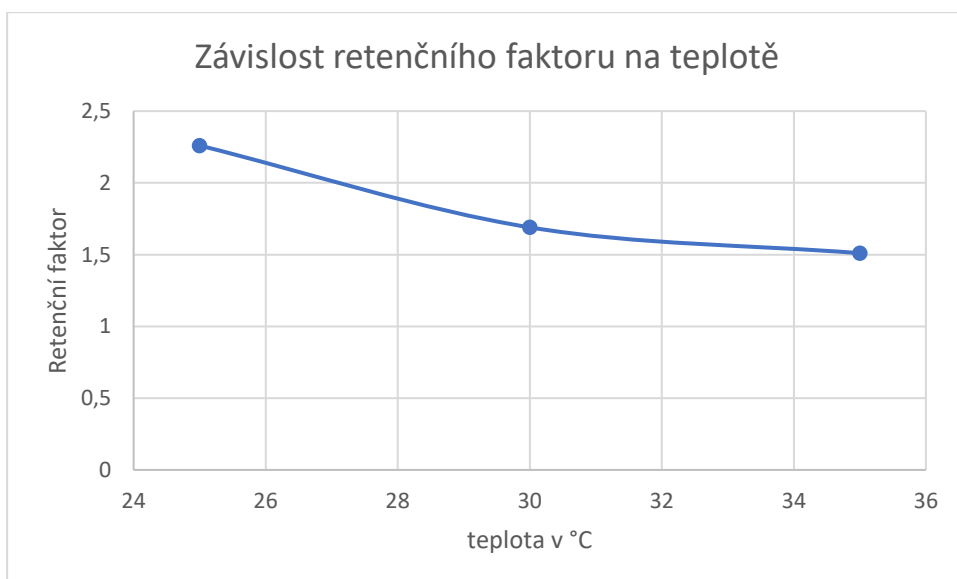
Tabulka 20 Výsledné parametry při zvýšení průtoku mobilní fáze

Průtok (ml/min)	Retenční čas (min)	Retenční faktor	Počet teoretických pater N
0,3	9,4	2,25	12048
0,5	5,2	2,24	9564

3.4 Optimalizace teploty

Optimalizace teploty v kolonovém prostoru může vést k významnému ovlivnění retenčního času. Důležitou výhodou vyšší teploty mobilní fáze je snížení její viskozity, přičemž dojde i ke snížení tlaku na koloně a menšímu opotřebování kolony. Z tohoto důvodu byla během vývoje metody optimalizována také teplota.³⁸

Při dosavadních analýzách byla udržována teplota v kolonovém prostoru na 25 °C. V další části vývoje metody zvýšení teploty na 30 °C způsobilo zkrácení retenčního času 3-hydroxykynureninu na 8,5 minuty. Dalším zvýšení teploty na 35 °C uspíšilo retenční čas na 7,8 min, což umožnilo zkrátit délku celé metody na 14 minut. Po 3-hydroxykynureninu se z kolony totiž eluují další látky obsažené v reálné matrici, mezi něž patří pravděpodobně i kynurenin. Závislost změny retenčního faktoru na teplotě je zobrazena na následujícím grafu č. 4.



Graf 4 Závislost retenčního faktoru na teplotě

Změna teploty v kolonovém prostoru neměla vliv na selektivitu metody při analýze biologického materiálu, nicméně s vyšší teplotou došlo ke značnému zkrácení celkové doby analýzy. Z tohoto důvodu byla vybrána nejvyšší testovaná teplota (35 °C).

3.5 Parametry vyvinuté metody

V následující tabulce č. 21 jsou uvedeny výsledné parametry, které byly zvoleny.

Tabulka 21 Parametry vyvinuté metody

Průtoková rychlost	0,3 ml/min
Kolona	YMC Triart PFP, 150 × 3 mm, 5 μm
Mobilní fáze	A: 100mM kyselina mravenčí B: methanol
Poměr A:B	95:5
Eluce	izokratická
Průtoková rychlost	0,3 ml/min
Teplota v kolonovém prostoru	35 °C
Detekce	UV/VIS 370 nm
Objem nástřiku	10 μl

3.6 Metoda zpracování vzorků

Úspěšnost precipitace byla sledována pomocí parametru výtěžnosti. Použití kyseliny chloristé vedlo k vyšším hodnotám výtěžnosti oproti kyselině trifluoroctové, nicméně precipitace pomocí silných kyselin nepřinášela opakovatelné výsledky výtěžnosti. Naproti tomu acetonitril poskytoval relativně vysoké a opakovatelné hodnoty výtěžnosti (88,6±1,7 %). Záznamy z měření výtěžnosti jsou zobrazeny v následující tabulce č. 22.

Tabulka 22 Výtěžnosti při použití precipitačních činidel a relativní směrodatné odchylky měření

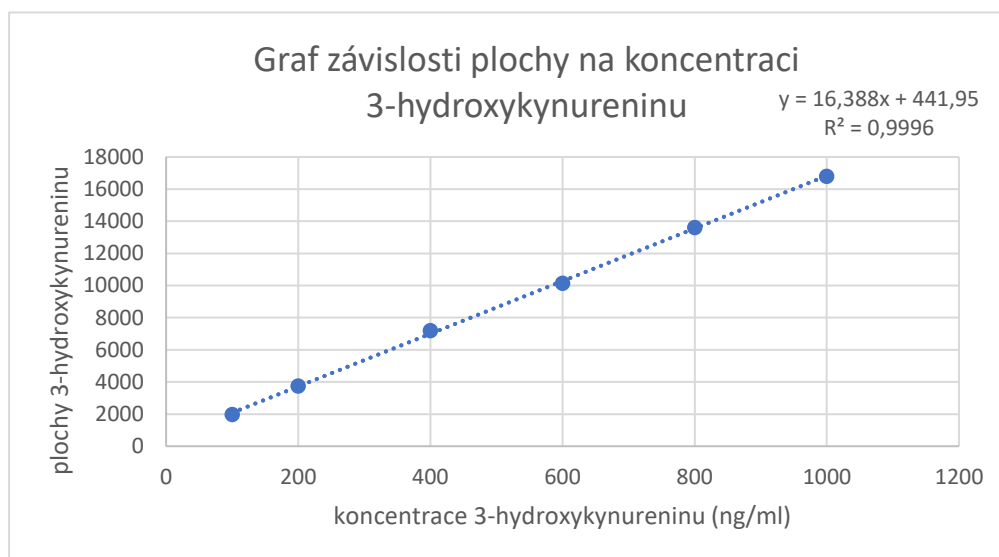
Precipitační činidlo	HClO ₄	CF ₃ COOH	ACN
Recovery (%)	95,78	58,70	87,49
	79,27	43,38	90,32
	59,59	42,83	87,99
RSD (%)	23,17	45,87	1,71

3.7 Validace

Daná HPLC metoda byla validována vybranými parametry s využitím směrnic FDA a EMA pro validaci bioanalytických metod: linearita, přesnost, preciznost, stabilita, selektivita, limit kvantifikace, výtěžnost a carry-over.

3.7.1 Linearita

Validační parametr linearita je popisován kalibrační přímkou, která demonstruje závislost odezvy detektoru na koncentraci stanovovaného analytu. Bylo připraveno šest kalibračních roztoků 3-hydroxykynureninu o známé koncentraci. Z výsledků byla pomocí metody lineární regrese zjištěna rovnice a korelační koeficient viz graf č. 5.



Graf 5 Zobrazení kalibrační přímkou pro důkaz lineární závislosti

Korelační koeficient R: 0,9997

Závěr: kalibrační přímkou prokázala linearitu. Hodnota limitu korelačního koeficientu bioanalytických metod je $>0,9990$. Korelační koeficient je v limitu.

3.7.2 Přesnost

Přesnost vyjadřuje těsnost shody mezi naměřenou hodnotou a přijatou referenční hodnotou. Pro stanovení přesnosti byly připraveny vzorky o třech koncentračních hladinách 3-hydroxykynureninu – 100 ng/ml, 500 ng/ml a 1000 ng/ml. Pro výpočet koncentrace byla použita rovnice lineární regrese.

Z důvodu omezeného množství biologické matrice byly od každé koncentrace připraveny pouze tři vzorky. Naměřené hodnoty a vypočtené odchylky jsou zobrazeny v následující tabulce č. 23.

Tabulka 23 Naměřené hodnoty ploch píků 3-hydroxykynureninu a výpočet odchylky

Koncentrace (ng/ml)	Plocha píků 3-hydroxykynureninu	Vypočítaná koncentrace (ng/ml)	Bias	Odchylka (%)
100	1943	91,59	7,91	7,91
	1926	90,56		
	1984	94,10		
500	8851	513,12	11,71	2,34
	8197	473,22		
	8284	478,52		
1000	16226	963,15	38,0	3,81
	16234	963,64		
	16161	959,18		

Závěr: odchylky pro všechny koncentrační hladiny vyhovují limitům stanovení přesnosti u bioanalytických metod. Dle limitu musí být odchylka nižší než 15 % pro koncentrace vyšší než LOQ a 20 % pro koncentrace odpovídající LOQ.

3.7.3 Preciznost

Pro stanovení preciznosti byly připraveny vzorky o třech koncentracích 3-hydroxykynureninu podobně jako při stanovení přesnosti – 100 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml. Pro výpočet koncentrací byla použita rovnice lineární regrese viz tabulka č. 24.

Tabulka 24 Naměřené hodnoty pro určení preciznosti a výsledné průměrné hodnoty a relativní směrodatné odchylky

Koncentrace (ng/ml)	Plocha píků 3-hydroxykynureninu	Vypočítaná koncentrace (ng/ml)	RSD (%)
100	1944	91,65	4,51
	1985	94,15	
	1854	86,16	
500	8265	477,35	0,45
	8197	473,20	
	8248	476,31	
1000	16109	955,98	3,40
	15520	920,04	
	15085	893,50	

Závěr: vypočítané relativní směrodatné odchylky vyhovují limitům pro stanovení preciznosti dané metody. Dle limitu je relativní směrodatná odchylka nižší než 15 % pro koncentrace vyšší než LOQ a 20 % pro koncentrace odpovídající LOQ.

Inter-day preciznost

V tabulce č. 25 a 26 jsou zobrazeny výsledky inter-day preciznosti při měření 3-hydroxykynureninu o koncentraci 100 ng/ml a 1000 ng/ml.

Tabulka 25 Výsledky měření a výpočet relativní směrodatné odchylky inter-day preciznosti 3-hydroxykynureninu o koncentraci 100ng/ml

Koncentrace 3-hydroxykynureninu 100 ng/ml			
	Plocha píku 3-hydroxykynureninu	Vypočítaná koncentrace (ng/ml)	RSD (%)
Den 1	1942	91,53	1,81
	1944	91,65	
	1956	92,39	
Den 2	1912	89,70	
	1985	94,15	
	1982	93,97	

Tabulka 26 Výsledky měření a výpočet relativní směrodatné odchylky inter-day preciznosti 3-hydroxykynureninu o koncentraci 1000ng/ml

Koncentrace 3-hydroxykynureninu 1000 ng/ml			
	Plocha píku 3-hydroxykynureninu	Vypočítaná koncentrace (ng/ml)	RSD (%)
Den 1	19787	997,35	2,71
	16955	1007,60	
	16817	999,18	
Den 2	16132	957,38	
	16301	967,69	
	15879	941,94	

Závěr: relativní směrodatné odchylky vypočítané z měření ve dvou po sobě následujících dnech vyhovují limitům inter-day preciznosti. Dle limitu musí být relativní směrodatná odchylka nižší než 15 % pro koncentrace vyšší než LOQ a 20 % pro koncentrace odpovídající LOQ.

3.7.4 Limit kvantifikace

K hodnocení limitu kvantifikace slouží relativní směrodatná odchylka koncentrací získaných analýzou šesti roztoků 3-hydroxykynureninu o koncentraci 100 ng/ml, tato koncentrace je nejnižší hodnotou v kalibrační řadě. Výsledky měření viz tabulka č. 27.

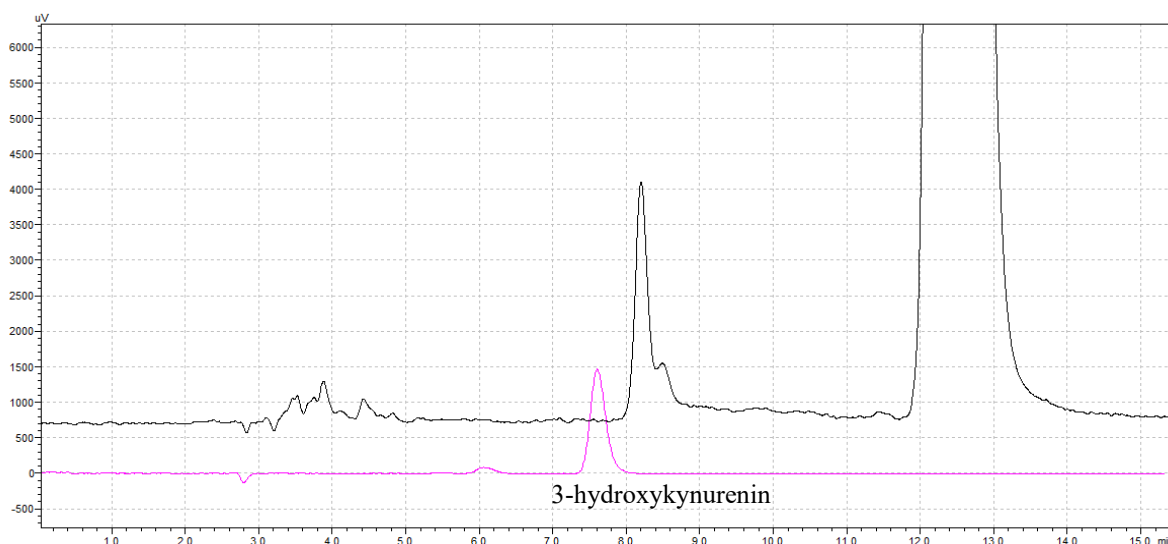
Tabulka 27 Výsledky měření limitu kvantifikace

Koncentrace 3-hydroxykynureninu (ng/ml)	Plocha píku	Vypočítaná koncentrace (ng/ml)	RSD (%)
100	1949	91,96	2,21
100	1987	94,28	
100	2015	95,99	
100	2006	95,44	
100	2054	98,37	
100	2003	95,26	

Závěr: za limit pro relativní směrodatnou odchylku na hladině limitu kvantifikace se považuje 20 %. Experimentálně získaná relativní směrodatná odchylka 3-hydroxykynureninu potvrzuje, že od 100 ng/ml jsou hladiny analytu kvantifikovatelné.

3.7.5 Selektivita

Selektivita vyvinuté metody je hodnocena pomocí roztoku standardu 3-hydroxykynureninu o koncentraci 1000 ng/ml, a roztoku biologické matrice bez přídavku 3-hydroxykynureninu. Porovnávány jsou chromatografické záznamy na obrázku č. 5.



Obrázek 5 Zobrazení selektivity, shora dolů biologická matrice, 3-hydroxykynurenin 1000 ng/ml

Závěr: vyvinutá metoda je selektivní, protože píky 3-hydroxykynureninu v obou koncentracích jsou dostatečně separovány od píků látek obsažených v biologické matrici.

3.7.6 Stabilita

Stabilita spikované matrice byla sledována v autosampleru při 8 °C, na světle při pokojové teplotě. Vzorby byly sledovány v časech t_0 , t_1 (po 24 hodinách) a t_2 (po 48 hodinách).

Dále byla sledována freeze thaw stabilita (zmrazení a rozmrazení 2krát za sebou v rámci 72 hodin) 1. zmrazení na 24 hodin, 2. zmrazení na 48 hodin).

Výsledky zkoušek stability viz tabulky 28, 29 a 30.

Tabulka 28 Výsledky stanovení stability 3-hydroxykynureninu v autosampleru

Koncentrace (ng/ml)	Plocha v čase t_0	Plocha v čase t_1	Plocha v čase t_2	Obsah 3-HK v t_1 (%)	Obsah 3-HK v t_2 (%)
500	9264	9113	7018	98,38	75,76

Tabulka 29 Výsledky stanovení stability 3-hydroxykynureninu při pokojové teplotě a na světle

Koncentrace (ng/ml)	Plocha v čase t ₀	Plocha v čase t ₁	Plocha v čase t ₂	Obsah 3-HK v t ₁ (%)	Obsah 3-HK v t ₂ (%)
500	9429	9101	5048	96,52	53,54

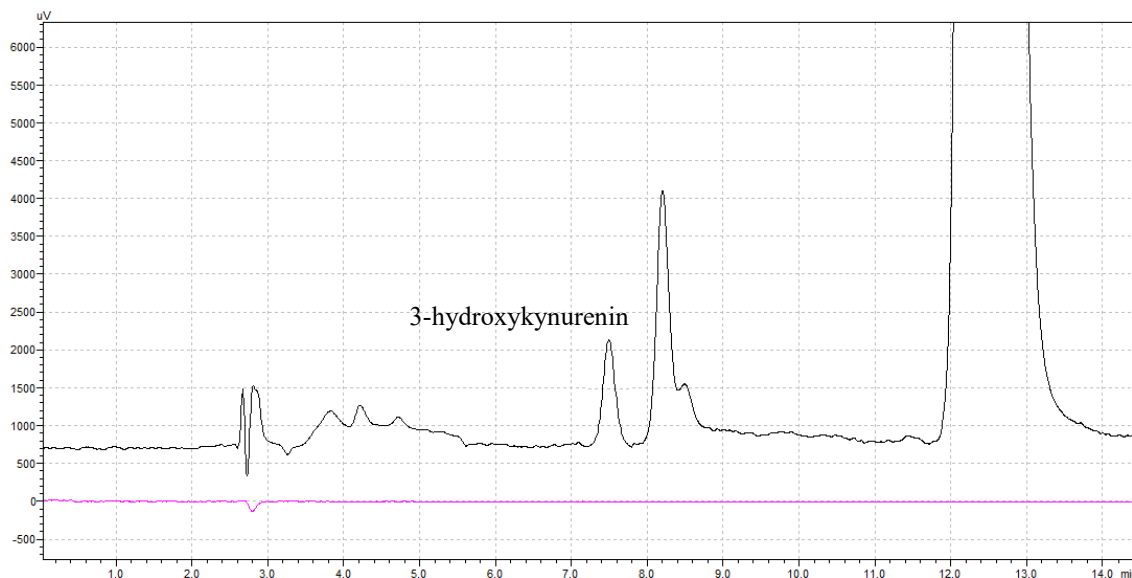
Tabulka 30 Výsledky stanovení freeze thaw stability 3-hydroxykynureninu

Koncentrace (ng/ml)	Plocha před zmrazením	Plocha po 1. zmrazení	Plocha po 2. zmrazení	Obsah 3-HK po 1. zmrazení (%)	Obsah 3-HK po 2. zmrazení (%)
500	9844	9710	6486	98,64	65,89

Závěr: stabilita po 24 hodinách odpovídá limitu do 15 % od původní hodnoty, po 48 hodinách už nikoliv. Snížení hladin 3-hydroxykynureninu mohl způsobit jeho rozklad působením světla i teploty. Z výsledků také vyplývá, že ani opětovné zmrazení a rozmrazení analytu neprospívá. Z těchto zjištění je patrné, že je třeba připravit nové standardy nebo spikované matrice před analýzou.

3.7.7 Carry-over

Validační parametr carry-over se hodnotí analýzou blanku neprodleně po analyzování roztoku s nejvyšší stanovovanou koncentrací analytu. Aby tento parametr splňoval limit, nesmí se v chromatogramu blanku nacházet pík vyšší než 20 % koncentrace na spodním limitu kvantifikace. Výsledek carry-over je znázorněn na následujícím obrázku č. 6.



Obrázek 6 Stanovení carry-over, shora dolů biologická matrice s 3-HK 1000 ng/ml, blank tvořený čištěnou vodou.

Závěr: tato metoda limitu vyhovuje, přenos vzorku nebyl prokázán.

3.7.8 Výtěžnost

Validační parametr výtěžnost popisuje účinnost procesu úpravy vzorku. Výtěžnost byla hodnocena jako množství 3-hydroxykynureninu přidaného k biologické matrici před úpravou vůči množství 3-hydroxykynureninu přidaného k biologické matrici až po úpravě. Hodnota výtěžnosti je uváděna jako relativní směrodatná odchylka viz tabulka č. 31.

Tabulka 31 Výsledky stanovení výtěžnosti 3-hydroxykynureninu a jejich relativní směrodatné odchylky

Koncentrace (ng/ml)	Plocha 3-hydroxykynureninu ve spikované matrici před precipitací	Plocha 3-hydroxykynureninu ve spikované matrici po precipitaci	Výtěžnost (%)	RSD (%)
100	1951	2066	94,59	0,17
	2116	2237		
	1898	2003		
500	8153	9017	88,28	2,20
	8284	9564		
	8265	9413		
1000	15519	17738	88,60	1,71
	16109	17835		
	15372	17471		

3.7.9 Shrnutí validace

V následující tabulce č. 32 jsou shrnuty všechny výsledné parametry validace metody.

Tabulka 32 Shrnutí validačních parametrů

Linearita	$y = 16,388x + 441,95$ $R = 0,9997$
Přesnost	Vyhovuje limitu
Preciznost	Vyhovuje limitu
Limit kvantifikace	Vyhovuje limitu
Selektivita	Prokázána
Stabilita	Po 24 hod. stabilní, po 48 hod. nestabilní
Carry-over	Neprokázán přenos
Výtěžnost	>88 %

Závěr

V této diplomové práci byla vyvinuta a optimalizována HPLC metoda pro stanovení metabolitu tryptofanu 3-hydroxykynureninu v biologickém materiálu. Daná metoda byla následně validována, aby bylo potvrzeno, zda je vhodná pro zamýšlený účel.

Teoretická část se věnuje poznatkům o tryptofanu a jeho metabolismu, při kterém vzniká mimo jiné 3-hydroxykynurenin. Dále se zabývá vlastnostmi 3-hydroxykynureninu získaných z publikací a dalším stanovením, při kterých byl již 3-hydroxykynurenin analyzován. Také shrnuje poznatky o vysokoúčinné kapalinové chromatografii a o validaci bioanalytických metod.

V experimentální části jsou uvedeny seznamy použitých přístrojů, laboratorních pomůcek a chemikálií. Také jsou popsány základní postupy přípravy použitých mobilních fází, roztoků standardů a vzorků. Finální parametry metody jsou uvedeny v kapitole 3.5. Součástí experimentální části je optimalizace úpravy biologického materiálu, především výběr vhodného precipitačního činidla.

Metoda byla validována s využitím směrnic FDA a EMA, mezi validované parametry byly zařazeny: linearita, přesnost, preciznost, limit kvantifikace, selektivita, stabilita, carry-over a výtěžnost.

Tato metoda byla vyvíjena pro stanovení aktivity enzymu kynurenin 3-monooxygenasy. V případě studia aktivity je sledována přeměna kynureninu na 3-hydroxykynurenin, který se ve vzorcích nachází ve vyšších než fyziologických koncentracích. Pro toto stanovení metoda splnila svůj účel.

Daná metoda však nemá potenciál při stanovování endogenního 3-hydroxykynureninu v biologické matrici, protože není dostatečně citlivá. Nejnižší koncentrace, která lze touto metodou stanovit kvantitativně, je 100 ng/ml, zatímco fyziologická koncentrace 3-hydroxykynureninu v plazmě je 8 ng/ml.³⁹

Zvýšení citlivosti metody by bylo možné dosáhnout pomocí MS detekce. Další možností by bylo využití derivatizační reakce například s *p*-toluensulfonyl chloridem za vzniku derivatizačního produktu, který by umožnil fluorescenční detekci, která je obecně citlivější než UV-VIS detekce.³⁹

Seznam zkratek

3-HK	3-hydroxykynurenin
CAD	Charged aerosol detector
CNS	Centrální nervový systém
ČL	Český lékopis
DPX	Disposable pipette extraction (extrakce ve špičkách pipet)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (kyselina ethylendiamintetraoctová)
EGTA	Ethyleneglycoltetraacetic acid (kyselina aminopolykarboxylová)
ELSD	Evaporative light scattering detector
EMA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
HIC	Hydrophobic interaction chromatography (hydrofobní interakční chromatografie)
HILIC	Hydrophilic interaction liquid chromatography (chromatografie hydrofilních interakcí)
HPLC	High performance liquid chromatography (vysokoučinná kapalinová chromatografie)
ICH	The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
IDO	Indolamin 2,3-dioxygenasa
IEC	Ion exchange chromatography (ionově výměnná chromatografie)
IFN- γ	Interferon gamma
IL-6	Interleukin 6
IL-1 α	Interleukin 1 alfa
IL-1 β	Interleukin 1 beta
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
KMO	Kynurenine 3-monooxygenase (kynurenin 3-monooxygenasa)
LLE	Liquid-liquid extraction (extrakce z kapaliny do kapaliny)
LOQ	Limit of quantification (limit kvantifikace)
LLOQ	Lower Limit of quantification (spodní limit kvantifikace)
MEPS	Micro-extraction by packed sorbent (mikroextrakce ve stříkačce)
MF	Mobilní fáze
MIPs	Molekular imprinted polymers (molekulárně vtištěné polymery)

NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide (nikotinamidadenindinukleotid)
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (nikotinamidadenindinukleotidfosfát)
NQAD	Nano quantity analyte detector
NP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na normální fázi
PFP	Pentafluorophenyl (pentafluorfenyl)
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride (fenylmethylsulfonylfluorid)
RAM	Restricted access material (materiál s omezeným přístupem)
ROS	Reactive oxygen species (reaktivní formy kyslíku)
RSD	Relativní směrodatná odchylka
SEC	Size exclusion chromatography (molekulově vylučovací chromatografie)
SPE	Solid-phase extraction (extrakce na tuhou fázi)
SSRI	Selektivní serotoninové reuptake inhibitory
TDO	Tryptofan 2,3-dioxygenasa
TRH	Tryptophan hydroxylase (tryptofanhydroxylasa)
TRYCAT	Tryptophan catabolites (katabolity tryptofanu)
UV	Ultrafialový
ULOQ	Upper limit of quantification (horní limit kvantifikace)
VIS	Visible spectrum (oblast viditelného světla)

Bibliografie

- [1] Český lékopis 2017. 1.vyd., Grada Publishing, Praha 2017. ISBN 978-80-271-0500-7.
- [2] PALEGO, L. et al. Tryptophan Biochemistry: Structural, Nutritional, Metabolic, and Medical Aspects in Humans. *J. Amino Acids*, **2016**, 2016, 13.
- [3] XU, K. et al. Redox Properties of Tryptophan Metabolism and the Concept of Tryptophan Use in Pregnancy. *Int. J. Mol. Sci.*, **2017**, 18, 1–28.
- [4] National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Summary for CID 6305, Tryptophan*, [on-line], [cit.2022-05-10]. Dostupné z: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tryptophan>>
- [5] WIGNER, P. et al. Oxidative and nitrosative stress as well as the tryptophan catabolites pathway in depressive disorders. *Psychiatr. Danub.*, **2017**, 29, 394–400.
- [6] SADOK, I. et al. Chromatographic analysis of tryptophan metabolites. *J. Sep. Sci.*, **2017**, 40, 3020–3045.
- [7] MAES, M. et al. The new '5-HT' hypothesis of depression: cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.*, **2011**, 35, 702–721.
- [8] MORONI, F. Tryptophan metabolism and brain function: focus on kynurenine and other indole metabolites. *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, 375, 87–100.
- [9] BOCCUTO, L. et al. Decreased tryptophan metabolism in patients with autism spectrum disorders. *Mol Autism.* **2013**, 4(1), 16. Dostupné z: <<https://doi.org/10.1186/2040-2392-4-16>>
- [10] LEIPNITZ, G. et al. In vitro evidence for an antioxidant role of 3-hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid in the brain. *Neurochem. Int.*, **2007**, 50, 83-94.
- [11] COLÍN-GONZÁLEZ, AL. et al. The Janus faces of 3-hydroxykynurenine: dual redox modulatory activity and lack of neurotoxicity in the rat striatum. *Brain. Res.*, **2014**, 1589, 1–14.

- [12] BADAWEY, AA.; Morgan, CJ. Rapid Isocratic Liquid Chromatographic Separation and Quantification of Tryptophan and Six kynurenine Metabolites in Biological Samples with Ultraviolet and Fluorimetric Detection. *Int. J. Tryptophan Res.* **2010**, *3*, 175–186.
- [13] WANG, LS. et al. LC-MS/MS-based quantification of tryptophan metabolites and neurotransmitters in the serum and brain of mice. *J. Chromatogr. B. Analyt Technol. Biomed. Life Sci.*, **2019**, *1112*, 24–32.
- [14] MARKLOVÁ, E. et al. Screening for defects in tryptophan metabolism. *J. Chromatogr. A.* **2000**, *870*, 289–293.
- [15] SCHWARZ, MJ. et al. Increased 3-hydroxykynurenine serum concentrations differentiate Alzheimer's disease patients from controls. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* **2013**, *263*, 345–352.
- [16] DE JONG, WHA. et al. Plasma tryptophan, kynurenine and 3-hydroxykynurenine measurement using automated on-line solid-phase extraction HPLC-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Analyt Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877*, 603–609.
- [17] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6305> [staženo 18. 4. 2022].
- [18] https://www.reaxys.com.ezproxy.is.cuni.cz/#/results/substances/0/RX002__236712941982374288/UlgwMDI9UyNIMDA1PUMjSDAwND1S/list/fc0ab6cb-9cc4-422c-a245-6d2149203921/1/desc/IDE.NUMREF/// [staženo 18. 4. 2022].
- [19] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/89> [staženo 18. 4. 2022].
- [20] https://www.reaxys.com.ezproxy.is.cuni.cz/#/results/substances/0/RX004__236712941982374288/UlgwMDQ9UyNIMDA5PUMjSDAwNz1S/list/f8591cd4-4232-41d9-ba27-ef9b85f05f03/1/desc/IDE.NUMREF/// [staženo 18. 4. 2022].
- [21] KLIMEŠ, J. et al. Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami. 2. vyd., Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové 2015. ISBN 978-80-260-8175-3.
- [22] NOVÁKOVÁ, L.; DOUŠA, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.* 1. vyd., Lucie Nováková, Praha 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.

- [23] KOVAŘÍKOVÁ P.; STARIAT J. *Kvalitativní a kvantitativní analýza, vývoj analytické metody* [on-line], [cit. 2022-01-12].
Dostupné z: <<https://dl1.cuni.cz/enrol/index.php?id=2904#L7>>
- [24] SNYDER, L. et al. *Introduction to modern liquid chromatography*. 3. vyd., Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. ISBN: 978-0-470-16754-0.
- [25] NOVÁKOVÁ, L.; DOUŠA, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. 1. vyd., Lucie Nováková, Praha 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [26] HANSEN, S. H., et al. *Introduction to Pharmaceutical chemical analysis*. John Wiley & Sons, Chichester 2012. ISBN 978-0-470-66122-2.
- [27] European Medicines Agency. *Guideline on bioanalytical method validation* [on-line], [cit. 2022-01-02]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf
- [28] International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)* [on-line], [cit. 2022-01-02]. Dostupné z: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>
- [29] Guidance for Industry. *Bioanalytical Method Validation* [on-line], [cit. 2022-01-02]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>
- [30] International union of pure and applied chemistry. *Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis*. [on-line], [cit. 2022-01-02]. Dostupné z: <https://publications.iupac.org/pac/2002/pdf/7405x0835.pdf>
- [31] <https://www.chromatographyonline.com/view/rules-of-thumb-for-reversed-phase-ic-what-s-in-your-chromatographic-mind> [staženo 2022-03-14].
- [32] https://www.ymc.co.jp/en/columns/ymc_triart_pfp/ [staženo 2022-03-14].
- [33] <https://ymc.eu/ymc-triart.html> [staženo 2022-03-14].
- [34] <https://www.phenomenex.com/Kinetex/CoreShellTechnology> [staženo 2022-03-14].
- [35] http://phx.phenomenex.com/lib/br27210615_W.pdf [staženo 2022-03-14].
- [36] <https://www.chromservis.eu/p/ymc-triart-pfp-s-3-m-12nm-analytical-hplc-column-50-x-4-6mm?lang=CZ> [staženo 2022-03-14].

- [37] VOLKA, K., et al. *Příklady z analytické chemie pro bakaláře*. 2. vyd., VŠCHT, Praha 2010. ISBN: 978-80-7080-743-9.
- [38] BILLEN, J. et al. Influence of pressure and temperature on the physic-chemical properties of mobile phase mixtures commonly used in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2008**, *1210*, 30–44.
- [39] PEARSON, S. J., REYNOLDS, G. P. Determination of 3-hydroxykynurenine in human brain and plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr.* **1991**, *565*, 436–440.