

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A FARMACEUTICKÉ**  
**ANALÝZY**



**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**STANOVENÍ METABOLITŮ TYROSINU**

**GABRIELA LICKOVÁ**

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

**Konzultant: Ing. Daniel Heblík**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2023**

„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 4.5. 2023

Gabriela Licková

## **Poděkování**

Zde bych ráda poděkovala svému školiteli PharmDr. Petru Kastnerovi, Ph.D. a konzultantovi Ing. Danielu Heblíkovi za pomoc při vypracování a sepsání diplomové práce. Po celou dobu vykonávání mé práce se mnou měli velikou trpělivost, dohlíželi na mě a dávali mi cenné rady. Poděkování patří i pracovníkům celé katedry za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Tato diplomová práce vznikla v letech 2022 a 2023 za podpory grantu GAUK 349 521 a SVV 260 666.

# Obsah

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | Úvod .....  | 9  |
| 2     | Cíl.....  | 10 |
| 3     | Teoretická část .....   | 11 |
| 3.1   | Katecholaminy.....  | 12 |
| 3.2   | Derivatizace.....   | 16 |
| 3.3   | HPLC instrumentace.....   | 20 |
| 3.3.1 | Zásobníky mobilní fáze.....   | 21 |
| 3.3.2 | Odplyňovač (degasser).....  | 21 |
| 3.3.3 | Vysokotlaké čerpadlo .....  | 21 |
| 3.3.4 | Automatické dávkování vzorku .....                                  | 22 |
| 3.3.5 | Chromatografické kolony pro HPLC .....                              | 22 |
| 3.3.6 | HPLC detekce.....   | 24 |
| 3.4   | Úprava vzorku biologického materiálu .....                          | 27 |
| 4     | Experimentální část.....  | 30 |
| 4.1   | Použité chemikálie, přístroje a pomůcky .....                       | 31 |
| 4.2   | Obecné postupy .....  | 33 |
| 4.2.1 | Příprava roztoků .....  | 33 |
| 4.2.2 | Příprava mobilní fáze (MF).....                                     | 36 |
| 4.3   | Popis práce .....   | 37 |
| 4.3.1 | Optimalizace derivatizačního postupu.....                           | 37 |
| 4.3.2 | Optimalizace HPLC systému .....                                     | 40 |
| 4.3.3 | Optimalizace extrakce .....   | 41 |
| 4.3.4 | Určení derivátů katecholaminů pomocí hmotnostní spektrometrie ..... | 42 |
| 4.4   | Výsledky a diskuse.....   | 43 |
| 4.4.1 | Optimalizace koncentrace derivatizačního činidla.....               | 43 |
| 4.4.2 | Optimalizace času derivatizační reakce .....                        | 45 |
| 4.4.3 | Optimalizace teploty derivatizace .....                             | 46 |
| 4.4.4 | Změna pH borátového pufru.....                                      | 47 |
| 4.4.5 | Změna koncentrace borátového pufru .....                            | 48 |
| 4.4.6 | Stanovení vhodného činidla pro ukončení derivatizace .....          | 49 |
| 4.4.7 | Výsledné parametry reakce .....                                     | 49 |
| 4.4.8 | Optimalizace chromatografie.....                                    | 50 |

|        |                                 |    |
|--------|---------------------------------|----|
| 4.4.9  | Optimalizace extrakce.....      | 55 |
| 4.4.10 | Určení derivátů pomocí MS ..... | 57 |
| 4.5    | Závěr.....                      | 60 |

# Abstrakt

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A FARMACEUTICKÉ ANALÝZY

**Kandidát:** Gabriela Licková

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

**Konzultant:** Ing. Daniel Heblík

**Název diplomové práce:** Stanovení metabolitů tyrosinu

Tématem diplomové práce bylo stanovení metabolitů tyrosinu (adrenalin, noradrenalin, dopamin, L-DOPA) s využitím derivatizační reakce a následnou analýzou za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenčním detektorem.

Stěžejním krokem celé práce byla optimalizace podmínek derivatizační reakce. Jako derivatizační činidlo byl použit FMOC-Cl (fluorenylmethoxykarbonyl chlorid), který reagoval s katecholaminy v přítomnosti borátového pufru. Nejprve byla stanovena vhodná koncentrace činidla (2,7 mM), čas (15 min) a teplota (40 °C) reakce. Dále byla optimalizována koncentrace (100 mM) a pH (8,0) borátového pufru.

Pro účinnou separaci bylo nutné nastavit vhodné podmínky. Kolona byla použita silikagelová Kinetex EVO C18 s částicemi s pevným jádrem. Složení mobilní fáze bylo nutné optimalizovat a výsledná mobilní fáze se skládala z kyseliny mravenčí (20 mM) a acetonitrilu v poměru 32:68. Výsledná použitá průtoková rychlost činila 0,6 ml/min. Kolona byla temperována na 40 °C. Nástřikový objem byl 5 µl a doba celé analýzy trvala 19 minut. Fluorescenční detektor byl nastaven na vlnovou délku 263 nm ( $\lambda_{ex}$ ) a 313 nm ( $\lambda_{em}$ ).

**Klíčová slova:** Tyrosin, Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin, L-DOPA, FMOC-Cl, Derivatizace, HPLC

## **Abstract**

**CHARLES UNIVERSITY**

**FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ**

**DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND  
PHARMACEUTICAL ANALYSIS**

**Candidate:** Gabriela Licková

**Supervisor:** PharmDr. Petr Kastner, Ph.D.

**Consultant:** Ing. Daniel Heblík

**Title of thesis:** Determination of tyrosine metabolites

The topic of thesis was determination of tyrosine metabolites (epinephrine, norepinephrine, dopamine, L-DOPA) using derivatization reaction and later analysis using High-performance liquid chromatography with fluorescence detector.

The important step of all work was optimization of conditions of derivatization reaction. As derivatization agent it was used FMOC-Cl (fluorenylmethyloxycarbonyl chloride), which reacted with catecholamines together with borate buffer. Firstly, it was set the ideal concentration of agent (2,7 mM), also the time (15 min) and the temperature (40 °C) of reaction. The concentration (100 mM) and pH (8,0) of borate buffer was optimized in the end.

For effective separation it was necessary to set ideal conditions. As silica gel column was used Kinetex EVO C18 with core-shell particles. The compositions of mobile phase was necessary to optimize and resulting mobile phase was composed from formic acid (20 mM) and acetonitrile in proportion 32:68. Used flow rate was 0,6 ml/min. The column was tempered at 40 °C. The injection volume was 5 µl and time of analysis was 19 minutes. The fluorescence detector was set on wavelengths 263 nm ( $\lambda_{ex}$ ) and 313 nm ( $\lambda_{em}$ ).

**Keywords:** Tyrosine, Epinephrine, Norepinephrine, Dopamine, L-DOPA, FMOCl, Derivatization, HPLC



# 1 Úvod

Diplomová práce se zaměřuje zejména na optimalizaci derivatizace katecholaminů, jejich separaci a detekci pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie zakončené fluorescenční detekcí.

Katecholaminy jsou hormony, které jsou produkovány v dřeni nadledvin, v adrenergických neuronech sympatiku a také v centrálním nervovém systému. Fungují zde jako neurotransmitery, tj. přenáší informaci mezi nervovými buňkami. Výchozí sloučeninou pro biosyntézu katecholaminů je L-tyrosin.

Teoretická část je věnována obecným poznatkům jednotlivých analytů, tj. chemické, biologické vlastnosti a biosyntéza. Další část je zaměřena na popis HPLC systému společně s jeho detektory a poslední část je věnována možnostem úpravy vzorku biologického materiálu.

V experimentální části je shrnuta příprava roztoků a samotných vzorků, která zahrnuje celý optimalizovaný proces derivatizace a výsledná optimalizace reakce je uvedena v kapitole 4.4.7. Následně je zde popsána optimalizace chromatografického systému a finální parametry celé analýzy jsou uvedeny v kapitole 4.4.8. Poslední části jsou věnovány samotné úpravě vzorku a také identifikaci derivátů pomocí MS.

## 2 Cíl

Cílem této diplomové práce bude vývoj a optimalizace stanovení katecholaminů (tyrosin, adrenalin, noradrenalin, dopamin a L-DOPA) pomocí derivatizace těchto analytů a jejich následné analýzy za použití HPLC s fluorescenčním detektorem.

Zásadním krokem naší práce bude zjištění vhodných podmínek pro účinnou derivatizaci. Experimentálně budou stanoveny vhodné parametry potřebné pro kvantitativní výtěžek z reakce, tj. koncentraci činidla, teplotu a čas reakce, optimální složení pufru a ukončení reakce. Následně bude struktura derivátů katecholaminů potvrzena pomocí MS.

Naše nastavení vhodných chromatografických podmínek bude vycházet z literatury. Nicméně bude třeba tyto podmínky následně upravit zejména pro zrychlení celé analýzy.

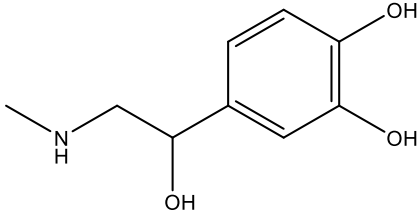
### **3 Teoretická část**

### 3.1 Katecholaminy

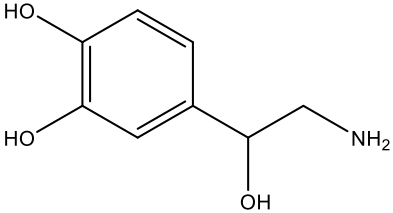
Katecholaminy jsou přirozeně se vyskytující aminy, které v organismu mají funkci neurotransmiterů a hormonů. Při stresu jsou syntetizovány a uvolňovány z dřene nadledvin a aktivují sympatikus, který je součástí vegetativního nervového systému. Jsou charakterizovány katecholovou strukturou, která je složena z benzenového jádra s připojenou hydroxylovou a aminovou skupinou. Zástupce skupiny tvoří adrenalin, noradrenalin, dopamin a L-DOPA viz tabulky 1; 2; 3 a 4. Ty jsou syntetizovány v neuronech vegetativního nervového systému čtyřmi enzymy. V presynaptickém zakončení zajišťuje tyrosinhydroxyláza vznik L-DOPA z tyrosinu viz tabulka 5. Dopamin je poté tvořen z L-DOPA pomocí L-aminokyselinové dekarboxylázy a sám se poté stává zdrojem pro vznik noradrenalinu za přítomnosti enzymu dopamin  $\beta$ -hydroxylázy. Nakonec z noradrenalinu vzniká adrenalin pomocí fenylethanolamin N-methyltransferázy viz Obrázek 1. [1] [2] [3]

Tyto hormony a neurotransmitery ovlivňují alfa-adrenergní a beta-adrenergní receptory na synapsi vegetativního nervového systému, čímž ovlivňují nejrůznější pochody v lidském těle a hrají důležitou roli při regulaci vnitřních orgánů. Kontrolují činnost hladkých svalů, exokrinní sekreci, funkci srdce a GIT. [4]

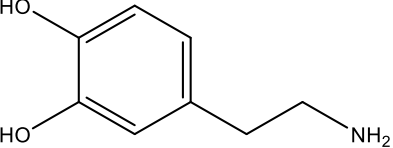
Tabulka 1

|                           | <b>Adrenalin</b>   |
|---------------------------|--|
| <i>Systematický název</i> | 4-(1-hydroxy-2-(methylaminoethyl) benzen-1,2-diol                                    |
| <i>Sumární vzorec</i>     | $C_9H_{13}NO_3$  |
| <i>Molární hmotnost</i>   | 183,2044 g/mol   |
| <i>Strukturní vzorec</i>  |  |

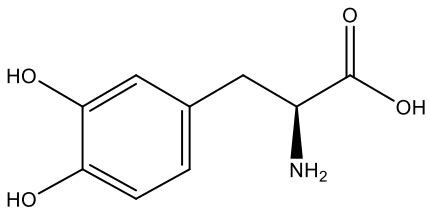
Tabulka 2

|                           | <b>Noradrenalin</b>  |
|---------------------------|--|
| <i>Systematický název</i> | 4-(2-amino-1-hydroxyethyl) benzen-1,2-diol   |
| <i>Sumární vzorec</i>     | $C_8H_{11}NO_3$  |
| <i>Molární hmotnost</i>   | 169,1778 g/mol   |
| <i>Strukturní vzorec</i>  |  |

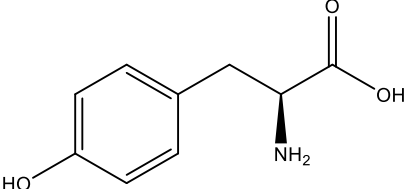
Tabulka 3

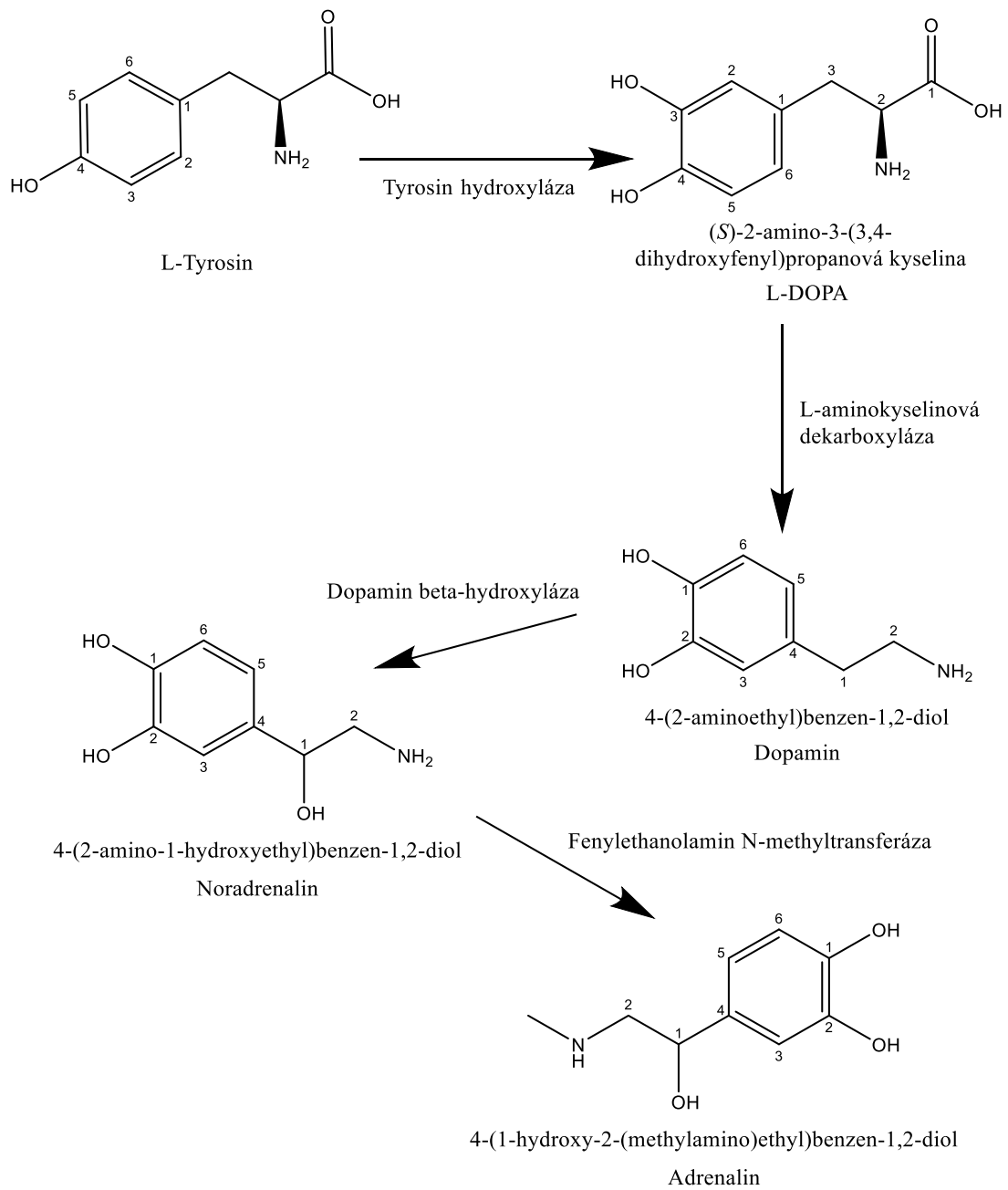
|                           | <b>Dopamin</b>   |
|---------------------------|--|
| <i>Systematický název</i> | 4-(2-aminoethyl)benzen-1,2-diol  |
| <i>Sumární vzorec</i>     | $C_8H_{11}NO_2$  |
| <i>Molární hmotnost</i>   | 153,1784 g/mol   |
| <i>Strukturní vzorec</i>  |  |

Tabulka 4

|                           | <b>L-DOPA</b>  |
|---------------------------|--|
| <i>Systematický název</i> | (S)-2-amino-3-(3,4-dihydroxyfenyl) propanová kyselina                              |
| <i>Sumární vzorec</i>     | $C_9H_{11}NO_4$  |
| <i>Molární hmotnost</i>   | 197,1879 g/mol   |
| <i>Strukturní vzorec</i>  |  |

Tabulka 5

|                           | <b>L-TYROSIN</b>   |
|---------------------------|--|
| <i>Systematický název</i> | (2S)-2-amino-3-(4-hydroxyfenyl) propanová kyselina                                   |
| <i>Sumární vzorec</i>     | $C_9H_{11}NO_3$  |
| <i>Molární hmotnost</i>   | 181,1885 g/mol   |
| <i>Strukturní vzorec</i>  |  |



Obrázek 1: Biosyntéza katecholaminů; vytvořeno pomocí ChemDraw Professional

## 3.2 Derivatizace

Derivatizace je strukturní modifikace analytu, která nám umožňuje změnit jeho fyzikálně-chemické vlastnosti a tím umožnit či vylepšit samotnou separaci. Derivatizace má vliv na eluci analyzovaných látek, na účinnost separace, selektivitu a dobu analýzy. Dále vznikem derivátů můžeme docílit zvýšení citlivosti detekce nebo samotnou detekci vůbec, např.: zavedením fluoroforu pro následnou fluorimetrickou detekci. Pro kvantitativní a kvalitativní analytické výsledky je třeba optimalizovat podmínky derivatizační reakce. Ta může být ovlivněna zejména teplotou, reakčním časem, koncentrací daného činidla či pH prostředí. Provedení samotné derivatizační reakce je možné třemi způsoby, tj. předkolonová, postkolonová a derivatizace probíhající na koloně. [5] [6]

Předkolonovou derivatizací (pre-column chromatography) vznikají deriváty ještě před samotnou separací na HPLC systému. Reakce by měla probíhat kvantitativně, selektivně, bez zbytečných vedlejších produktů a deriváty by měly být dostatečně stabilní. Derivatizační činidlo by mělo být dostatečně separované od svých produktů na koloně. Výhodou předkolonové derivatizace je, že nemusí probíhat rychle. Nevýhodou může být obtížná reprodukovatelnost výsledků. [5] [6]

### Derivatizační činidla

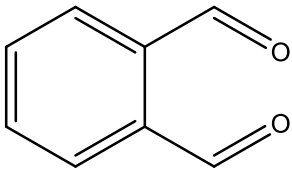
Protože katecholaminy neobsahují dostatečně silné chromoforové ani fluoroforové skupiny, je pro jejich detekci potřebné zavedení této skupiny, tj. zavedení fluoroforu pro fluorimetrickou detekci. Jako derivatizační činidla se používají *o*-ftalaldehyd (OPA), benzoylchlorid (BZ-Cl), dansylchlorid (DNS-Cl) a 9-fluorenylmethyloxykarbonylchlorid (FMOC-Cl). Pro naše experimenty byl zvolen FMOC-Cl, který ochotně reaguje i se sekundárními aminy a tudíž můžeme pozorovat vznik derivátů všech našich studovaných analytů včetně adrenalinu. [7]



## OPA

Jedná se o derivatizační činidlo, které konjuguje s primárními aminy a thioley viz tabulka 6. Toho se využívá při fluorimetrické detekci vzorků biologického původu, které obsahují peptidy, proteiny a biogenní aminy. [8]

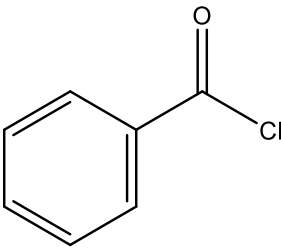
Tabulka 6

|                            | <b>OPA</b>  |
|----------------------------|---|
| <i>Systematický název</i>  | Benzen-1,2-dikarboxaldehyd  |
| <i>Sumární vzorec</i>      | C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>                                      |
| <i>Molekulová hmotnost</i> | 134,13 g/mol  |
| <i>Strukturní vzorec</i>   |  |

## BZ-Cl

BZ-Cl se používá v analytické chemii k identifikaci derivátů, tj. derivátů s navázanou benzoylovou skupinou viz tabulka 7. Činidlo ochotně reaguje s látkami obsahujícími alkoholovou, fenolovou a amino skupinu. [9]

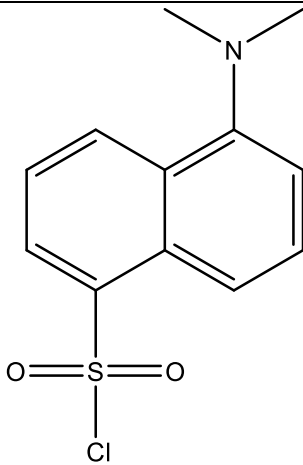
Tabulka 7

|                            | <b>BZ-Cl</b>  |
|----------------------------|---|
| <i>Systematický název</i>  | Benzoyl-chlorid   |
| <i>Sumární vzorec</i>      | C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> ClO   |
| <i>Molekulová hmotnost</i> | 140,56 g/mol  |
| <i>Strukturní vzorec</i>   |  |

## DNS-Cl

Široce využívané činidlo zejména pro analýzu aminokyselin. DNS-Cl reaguje s primární amino skupinou alifatických i aromatických aminů, přičemž vznikají fluorescenční sulfonamidové deriváty viz tabulka 8. [10] [11]

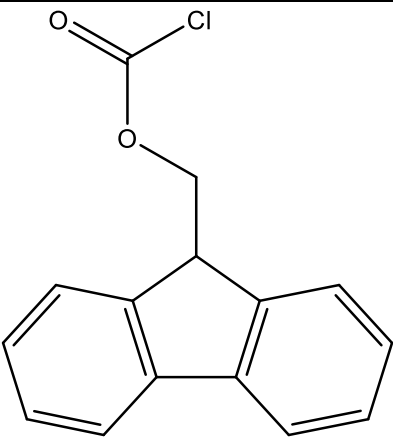
Tabulka 8

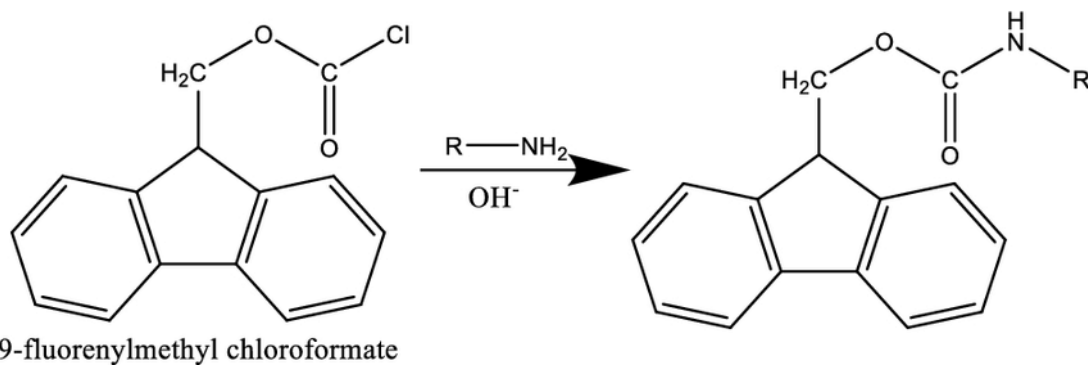
| DNS-Cl                     |   |
|----------------------------|---|
| <i>Systematický název</i>  | 5-(dimethylamino)naftalen-1-sulfonyl chlorid  |
| <i>Sumární vzorec</i>      | $C_{12}H_{12}ClNO_2S$   |
| <i>Molekulová hmotnost</i> | 269,75 g/mol  |
| <i>Strukturní vzorec</i>   |  |

## FMOC-Cl

FMOC-Cl ochotně reaguje s primárními i sekundárními aminy a také s hydroxy skupinami viz Obrázek 2 a tabulka 9. Vzniklé deriváty jsou stabilní spíše v neutrálním a mírně kyselém prostředí. [7]

Tabulka 9

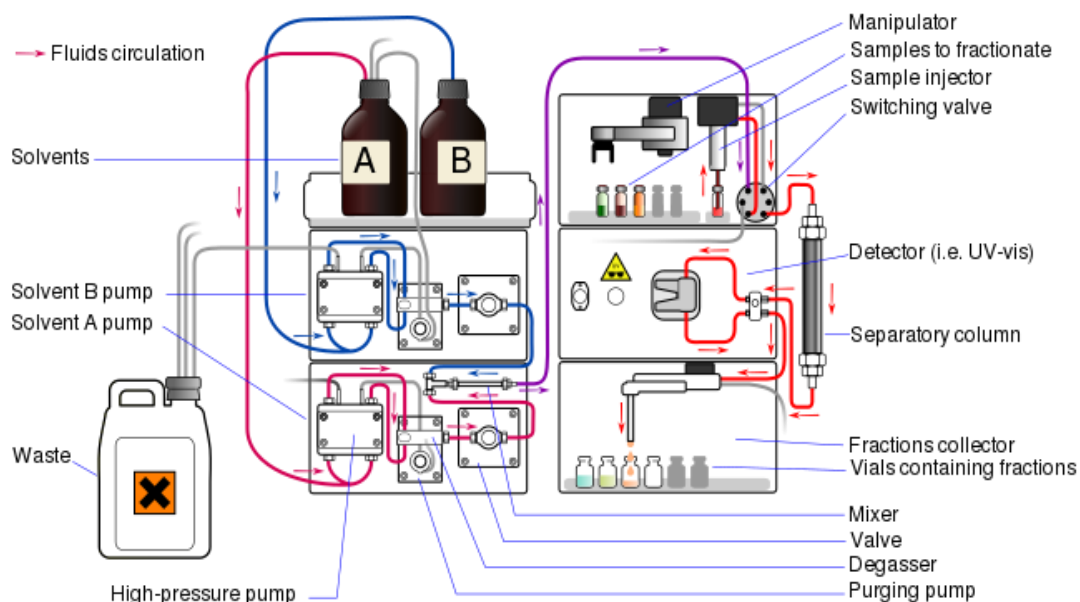
|                            | <b>FMOC-Cl</b>  |
|----------------------------|---|
| <i>Systematický název</i>  | 9-fluorenylmethoxykarbonyl chlorid  |
| <i>Sumární vzorec</i>      | C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClO <sub>2</sub>                                    |
| <i>Molekulová hmotnost</i> | 258,70 g/mol  |
| <i>Strukturální vzorec</i> |  |



Obrázek 2: Schéma znázorňující reakci mezi amino skupinou a FMOC-Cl [18]

### 3.3 HPLC instrumentace

Kapalinový chromatograf se skládá z několika komponent a celý proces analýzy je řízen chromatografickým softwarem. Jednu z prvních částí HPLC systému tvoří zásobníky mobilní fáze, která je pomocí pump vhnána pod vysokým tlakem do celého systému. Důležitou částí je degasser, který slouží k odplynění MF. Následně automatický dávkovač nastříkuje daný vzorek do proudu mobilní fáze a tato směs dále prochází termostatovaným prostorem do chromatografické kolony, kde dochází k separaci analytů. Jednotlivé analyty jsou nakonec detekovány v příslušném detektoru, který je umístěný za kolonou. [6]



Obrázek 3: Schéma HPLC systému. [19]

### 3.3.1 Zásobníky mobilní fáze

Nejčastěji se jako zásobníky mobilní fáze využívají skleněné nádoby, které musí být udržovány v patřičné čistotě pro HPLC, aby nedocházelo k případné kontaminaci systému. U nádob je třeba také vhodný uzávěr, aby nedocházelo odpařování chemikálií a případné kontaminaci prachovými částicemi a dalšími nečistotami. Mobilní fáze je nasávána přes speciální frity s porozitou 10-20  $\mu\text{m}$ , které zachycují zbytky nečistot a dalších tuhých částic. Kapiláry vedoucí mobilní fázi celým systémem jsou zhotoveny z inertního materiálu např. polyethylenu nebo teflonu. [6]

### 3.3.2 Odplyňovač (degasser)

Přítomnost plynů v mobilní fázi je nežádoucí, a proto je degasser součástí moderních HPLC systémů. Odplynění mobilní fáze je potřebné k eliminaci několika problémů, jako je nestabilita základní linie, neopakovatelné retenční časy, špatná opakovatelnost dávkovaného objemu, zavzdušnění čerpadla a jeho nestabilní funkčnost, nestabilita signálu detektoru. Přítomné plyny mohou ovlivnit i detekci a to zejména přítomnost kyslíku při fluorescenční detekci. Molekuly kyslíku mohou negativně ovlivnit odezvu detektoru svým působením na emisní záření. Nejčastěji je užíván vakuový degasser, který je tvořen vakuovou komorou s integrovanou semipermeabilní membránou a pomocí vakuové pumpy je zde tvořeno vakuum. Snížený tlak je potřebný k prostupu plynů z mobilní fáze přes semipermeabilní membránu. [6]

### 3.3.3 Vysokotlaké čerpadlo

Čerpadlo zajišťuje vlastní pohyb mobilní fáze v HPLC systému. Musí zajistit bezpulzní, reprodukovatelné a přesné čerpání MF. Nestabilní průtok může způsobit kolísání  $R_t$  a nepřesnosti v samotných výsledcích analýzy. Samotné rozmezí možných průtoků bývá relativně široké od 0,01 ml/min až k desítkám ml/min. Rozsah tlaků je obvykle omezen u HPLC systémů do 40 MPa. Rozlišujeme dva druhy čerpadel, na ta, která pracují při konstantním tlaku a na ta která pracují při konstantním objemovém průtoku. Momentálně se převážně užívají čerpadla

s konstantním objemovým průtokem, které k pohybu pístu využívají mechanický pohon. [6]

### **3.3.4 Automatické dávkování vzorku**

Dávkování malého množství kapalného vzorku do systému musí být prováděno s vysokou přesností, správností a s minimální disperzí. Autosampler se skládá ze dvou hlavních částí. Nástřikové zařízení zajišťuje přesné dávkování vzorku na kolonu. Dále je zde prostor pro uchování vzorku ve vialkách. Dnešní autosamplery umožňují chlazení prostoru a vzorek je zde uchováván bez přístupu světla. [6]

### **3.3.5 Chromatografické kolony pro HPLC**

Kolony se skládají ze dvou částí, z trubicovitého těla kolony s hladkým vnitřním povrchem a z koncovky. Koncovka obstarává těsnost systému, zadržení náplně kolony a rovnoměrnou distribuci mobilní fáze. Samotný plášť kolony je nejčastěji tvořen z nerezové oceli. Vnitřek kolony pak tvoří sorbent, který má různé parametry, tj. druh sorbentu, velikost a tvar částic. Sorbent by měl v ideálním případě odolávat vysokým tlakům, chemickému působení MF a měl by být dokonale hladký. Pro analýzu jsou dnes využívány HPLC kolony o vnitřním průměru 2,1-5 mm, o délce 10-300 mm a velikostí částic v rozmezí 1-5  $\mu\text{m}$ . [6]

Na stacionární fázi dochází k vlastní separaci analytů. Sorbenty mohou být rozděleny do několika typů dle chromatografického módu: normální, reverzní, iontově výměnné, HILIC (hydrofilní interakční chromatografie), HIC (hydrofobní interakční chromatografie) a gely. Nejčastěji jsou užívány kolony na bázi silikagelu, ale používají se i sorbenty složené například z oxidu zirkoničitého, oxidu hlinitého, organických polymerů nebo grafitového uhlíku.

Při analýze v systému s reverzní fází je stacionární fáze méně polární než MF. Nejčastěji užívaný je silikagel modifikovaný C18 skupinou. Tento povrch interaguje s analytem pouze slabými disperzními silami. Pro zvýšení účinnosti a zrychlení celé analýzy je možné použití povrchově porézních částic (core-shell particles), které se skládají z pevného jádra a vrstvy porézního silikagelu. [6]

## **Stacionární fáze na bázi silikagelu**

Sorbenty na bázi silikagelu mají vysokou mechanickou odolnost a je možné vyrobit částice s definovanou velikostí a distribucí pórů. Povrch silikagelu tvoří silanolové skupiny, které lze dále modifikovat funkčními skupinami, tj. C8, C18, fenyl, propylamin, pentafluorfenyl atd. Od vlastností navázaného ligandu se odvíjí selektivita stacionární fáze. Nevýhodou těchto sorbentů může být jejich nízká stabilita v některých úsecích pH, tj. silně alkalická a bazická oblast pH. Stacionární fáze modifikovaná C18 skupinou je dlouhodobě stabilní v rozmezí pH 2-9. Při nízkých hodnotách pH může docházet k hydrolyze a ztrátě navázané funkční skupiny neboli column bleeding. [6] [12]

## **Polymery**

Sorbenty jsou nejčastěji tvořeny z methakrylátů, polyvinylalkoholů a polystyrenu. Jejich povrch je možné dále modifikovat. Oproti stacionární fázi na bázi silikagelu jsou polymery stabilnější ve větším rozmezí pH a i při vyšších teplotách. Nevýhodou těchto sorbentů je možné bobtnání či srážení fáze při použití většího podílu organické fáze. Lze je využít pro analýzu malých molekul i biomolekul. [6] [12]

## **Oxidy kovů**

Nejpoužívanější je oxid zirkoničitý, ale existují i další sorbenty na bázi  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Stacionární fáze vykazují vysokou stabilitu v širokém rozmezí pH i teplot (pH 1-13; až 160 °C). I přes vyšší stabilitu je použití těchto fází minimální. [12]

## **Grafitizovaný uhlík**

Sorbent je tvořen plně porézními částicemi, které jsou uspořádány planárně ve vrstvách. SF odolává celému rozmezí pH a teplotě až do 200 °C. Nevýhodou je nižší účinnost v porovnání se standardním silikagelem a menší odolnost vůči vyšším tlakům. Je možné užití této SF při analýze stereoizomerů a polohových izomerů. [6] [12]

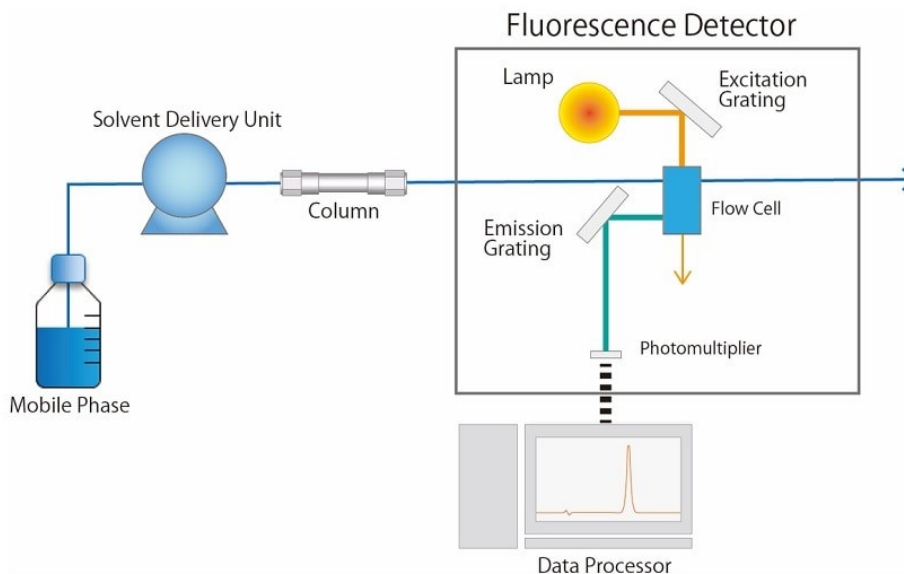
### 3.3.6 HPLC detekce

Detektory jsou uloženy za kolonou a zaznamenávají signály při průchodu MF. Ideální detektor by měl být vysoce citlivý, univerzální, selektivní, nedestruktivní a dále by signál neměl být ovlivněn složením MF, teplotou ani průtokem. Pro analýzu s HPLC systémem je možné využití několika typů detektorů např.: fluorescenční, spektrofotometrická, chemiluminiscenční, elektrochemická a hmotnostně spektrometrická detekce. [6]

#### Fluorescenční detektor

Principem detekce je měření emisního záření, které je uvolněno po absorpci excitačního elektromagnetického záření. Po absorpci elektromagnetického záření přecházejí elektrony daných molekul ze stabilního stavu do vyšších energetických hladin excitovaného stavu. Absorbovanou energii mohou molekuly ztrácet v důsledku srážek s jinými molekulami či může být přeměněna na energii vibrační anebo ji vyzářit formou fluorescence. Toho se využívá při fluorescenční detekci, jejíž výhodou je vysoká selektivita, kdy jsou měřeny specifické vlnové délky pro dané molekuly. Výsledky analýzy nejsou ovlivněny zbylým složením MF, protože fluorescenční detektor není schopen detekce látek bez příslušného fluoroforu. [6]  
[13]





**Obrázek 4: Schéma fluorescenčního detektoru. Nejčastěji se jako zdroj světla užívá xenonová výbojka. Excitační mřížkou je z vyzářeného světla vybrán paprsek o konkrétní vlnové délce, který dále prochází průtokovou celou. V průtokové cele absorbuje daná látka toto záření s určitou vlnovou délkou a je excitována. Emitované světlo je dále štěpeno emisní mřížkou a přeměněno fotonásobičem na elektrický signál. [13]**

## Hmotnostní spektrometrie ve spojení s HPLC

MS je analytická metoda, která je založena na principu ionizace molekul v plynné fázi a jejich následné separaci dle poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). Výstupem detekce je hmotnostní spektrum, ve kterém jsou ionty zobrazeny dle jejich intenzity a  $m/z$ . MS lze použít k identifikaci a kvantifikaci analytů ve vzorku. Detektor je složen ze tří hlavních částí, tj. zdroj ionizace, hmotnostní analyzátor a detekční oblast. Nejprve musí dojít k ionizaci analytu, kdy jsou neutrální molekuly přeměněny na ionty. Existuje několik typů ionizačních technik, které jsou uskutečňovány za přítomnosti vakua nebo atmosférického tlaku. Poté jsou vzniklé ionty separovány dle příslušného poměru  $m/z$  v hmotnostním analyzátoru za přítomnosti vakua. V detekční oblasti dojde k detekci jednotlivých iontů a zesílení signálu pomocí fotonásobiče, elektronásobiče či mikrokanálové destičky. [6] [14]

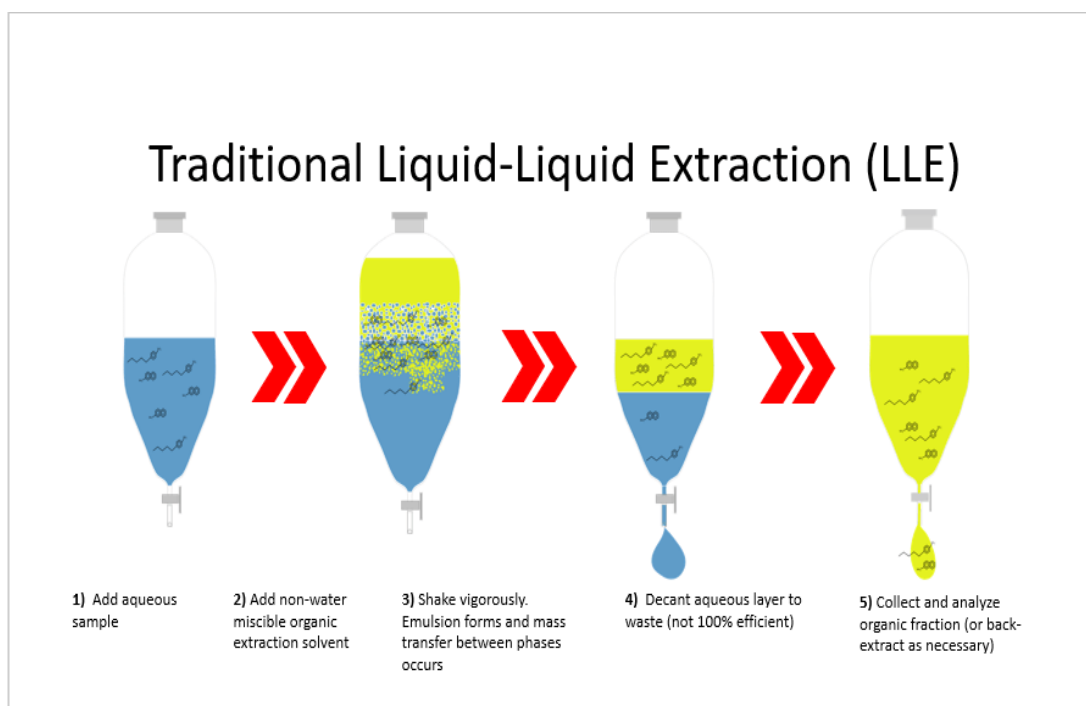
Samotná ionizace je ovlivněna některými vlastnostmi analyzované látky (molekulovou hmotností, polaritou, těkavostí a tepelnou stabilitou). Ionizační techniky můžeme rozdělit do dvou skupin, na měkké a tvrdé. K měkkým technikám řadíme ionizaci pomocí elektrospreje (ESI), chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI), fotoionizaci za atmosférického tlaku (APPI) či ionizaci desorpcí laserem za účasti matrice (MALDI). U měkkých ionizačních technik pozorujeme minimální fragmentaci molekul. Měření může probíhat v kladném módu, kdy vznikají protonované molekuly  $[M+H]^+$  nebo v záporném módu za vzniku deprotonovaných molekul  $[M-H]^-$ . Pro zplynění kapalného vzorku je třeba kontinuální přítomnosti pomocných plynů, tj. dusíku nebo stlačeného vzduchu. [6]

Hlavní úlohou hmotnostního analyzátoru je separace iontů dle poměru  $m/z$  za přítomnosti vakua a následné urychlení těchto iontů. Existuje několik typů analyzátorů, které pracují na odlišném fyzikálním principu např.: kvadrupól (Q), trojitý kvadrupól (QqQ), analyzátor doby letu (TOF), iontová cyklotronová rezonance (ICR) a iontová past (LIT). Iontová past rozděluje ionty na základě jejich odlišné stability oscilací, která je ovlivněna kombinací stejnosměrného a střídavého napětí. [6]

### 3.4 Úprava vzorku biologického materiálu

Separční metody jsou jedním ze základních procesů využívaných v chemické laboratoři. Slouží zejména k izolaci jednotlivých analytů ze směsi, k čištění vzorků či slouží jako důležitá předfáze kvalitativního a kvantitativního analytického stanovení. Mezi separační techniky patří i úpravy, které zahrnují precipitaci, extrakci z kapaliny do kapaliny (LLE) a extrakci na pevnou fázi (SPE). [15]

LLE je separační technika, při které dochází k oddělení složek směsi na základě jejich rozdílné rozpustnosti viz obrázek 5. Extrakční prostředí tvoří dvě vzájemně nemísitelné fáze. Jedním z rozpouštědel bývá polární vodná složka a druhým nepolární organická látka. Extrahovaná látka je tedy vytřepávána do organické fáze. Výtěžnost extrakce může být ovlivněna hodnotou pH. Pro přechod analytů do organické fáze je potřebná jejich neionizovaná forma, a proto je nutné upravení hodnoty pH u bazických a kyselých látek. Neméně důležitý je i výběr vhodného organického rozpouštědla, ve kterém by měl být daný analyt co nejlépe rozpustný. Dalšími kritérii pro výběr rozpouštědla je vysoká těkavost, nízká viskozita a minimální mísitelnost s H<sub>2</sub>O. Výtěžnost extrakce je také ovlivněna množstvím použitého rozpouštědla a dobou extrakce. Při opakování extrakce s menším objemem je dosahováno větší výtěžnosti nežli extrakcí s velkým objemem rozpouštědla. Tato metoda dosahuje vysokých výtěžností extrakce zejména u nepolárních analytů, které ochotně přecházejí do organické fáze. Výhodou metody je jednoduchost a nenáročnost na laboratorní vybavení. Možnou nevýhodou této metody je značná časová náročnost, spotřeba organických rozpouštědel a složitá procesní automatizace. [16] [15] [17]



Obrázek 5: Extrakce z kapaliny do kapaliny [15]

## SPE

Principem extrakce na pevnou fázi je interakce mezi separovanou látkou a pevnou stacionární fází. Samotná extrakce je ovlivněna fyzikálně-chemickými vlastnostmi daných látek. První krok extrakce činí kondicionace, kdy dochází k aktivaci sorbentu po promytí organickým rozpouštědlem. Rozpouštědlo musí být posléze vymyto vodou a následně může být aplikován vzorek. Po zadržení analytů na sorbentu následuje jeho promývání vhodnými rozpouštědly (voda, pufr) k odstranění balastních látek z matrice. Nakonec jsou příslušné analyty eluovány z pevné fáze pomocí specifického rozpouštědla (methanol, acetonitril), které naruší jejich vzájemnou interakci. SPE je nenáročná metoda, která poskytuje reprodukovatelné výsledky. Možnou výhodou je online spojení SPE s HPLC systémem. [15] [17]

## Precipitace

Je jedna z nejjednodušších separačních technik, kterou lze odstranit proteiny ze vzorku biologického materiálu pomocí precipitačního činidla. Po přidání činidla je vzorek protřepáván a vysrážené proteiny jsou odděleny centrifugací. Jako precipitační činidla se používají zejména organická rozpouštědla (acetonitril, methanol, ethanol), silné anorganické ( $\text{HClO}_4$ ,  $\text{HCl}$ ) i organické kyseliny ( $\text{CF}_3\text{COOH}$ ,  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ) a dále roztoky některých solí ( $\text{ZnSO}_4$  v  $\text{NaOH}$ ). Výběr optimálního činidla je ovlivněn vlastnostmi biologického vzorku i daných analytů. Precipitace je rychlá a jednoduchá metoda. Nevýhodou mohou být zbylé balastní látky ve vzorku, které nejsou na bázi proteinů a dále možné ztráty analytu v důsledku vazby na precipitát. [17]

## 4 Experimentální část

## 4.1 Použité chemikálie, přístroje a pomůcky

### Chemikálie

- (+)-Adrenalin hydrochlorid: Sigma-Aldrich, Německo
- 3,4-dihydroxy-L-phenylalanin: Sigma-Aldrich, Německo
- Acetonitril for HPLC: VWR Chemicals
- Dihydroxybenzylamin: Sigma-Aldrich, Německo
- Dichlormethan: Penta s.r.o., Česká republika
- DL-noradrenalin-hydrochlorid: Sigma-Aldrich, Německo
- Dopamin hydrochlorid: Sigma-Aldrich, Německo
- Ethylacetát: Lach-Ner, Česká republika
- Fluorenylmethyloxykarbonylchlorid (Fmoc-Cl): Sigma-Aldrich, Německo
- Glycin: Sigma-Aldrich, Německo
- Hexan: Sigma-Aldrich, Německo
- Hydroxid sodný: Penta s.r.o., Česká republika
- Kyselina boritá: Lach-Ner, Česká republika
- Kyselina citronová: Penta s.r.o., Česká republika
- Kyselina mravenčí: Sigma-Aldrich, Německo
- Kyselina octová 99%: Penta s.r.o., Česká republika
- L-tyrosin: Sigma-Aldrich, Německo
- Methyl-terc-butyl-ether: Sigma-Aldrich, Německo

## **Přístroje**

- Analytické váhy: Sartorius A200S Electronic Analytical Balance, Sartorius analytical, Německo
- Elektronická odsávačka: MEVACS, MEDIST SLOVAKIA s.r.o.
- Magnetická míchačka: Color squid, Ika Werke, Německo
- pH metr: CHOTT CG 843, Schott Instruments, Německo
- Thermomixer comfort, Eppendorf
- Třepačka: Vortex, VELP Scientifica, Itálie
- Ultrazvuková lázeň: Kraintek K-10, KRAINTEK s.r.o, Česká republika

## **HPLC**

- HPLC jednotka: Shimadzu, Japonsko
- Řídící jednotka: CBM-20A
- Degasser: DGU-20A<sub>3</sub>
- Čerpadlo: LC-20AD<sub>xr</sub>
- Autosampler: SIL-20AC<sub>xr</sub>
- Termostat kolony: CTO-20AC
- Detektor: Fluorescence RF-10A<sub>XL</sub>
- Pc program: Lab Solutions, version 5.97 SP 1

## **Hmotnostní spektrometr**

- MS jednotka: THERMO ELECTRON CORPORATION, U.S.A.
- Model: Finnigan LCQ Advantage MAX
- Pc program: Xcalibur 2.0



## Další pomůcky

Vialky, víčka, septa, kádinky, Eppendorf zkumavky, odměrné baňky, skleněné zátky, odsávací baňka, frity, filtry (velikost pórů 0,22  $\mu\text{m}$ ), laboratorní lžičky, automatické pipety, špičky.

## 4.2 Obecné postupy

### 4.2.1 Příprava roztoků

#### Zásobní roztoky standardů metabolitů tyrosinu (0,1 mg/ml)

Přibližná navážka katecholaminů a jejich prekurzorů: 0,0005 g

Pomocí ultrazvukové lázně byly jednotlivé navážky daných sloučenin rozpuštěny v patřičném objemu rozpouštědla, tak aby jejich výsledná koncentrace činila 0,1 mg/ml. Dle rozpustnosti jednotlivých katecholaminů byla zvolena vhodná rozpouštědla viz tabulka 10. Kyselina mravenčí byla přidávána kvůli stabilitě daných sloučenin.

Tabulka 10

|                            | <b>Methanol</b> | <b>Kyselina mravenčí</b> |
|----------------------------|-----------------|--------------------------|
| <b>Adrenalin</b>           | 50%             | 0,1%                     |
| <b>Noradrenalin</b>        | 50%             | 0,1%                     |
| <b>L-DOPA</b>              | 50%             | 0,1%                     |
| <b>Tyrosin</b>             | 10%             | 0,1%                     |
| <b>Dopamin</b>             | 10%             | 0,1%                     |
| <b>Dihydroxybenzylamin</b> | 10%             | 0,1%                     |

### **Pracovní roztoky metabolitů tyrosinu (1 µg/ml)**

10µl zásobního roztoku standardu bylo doplněno vodou na 1 ml. Připravovány byly pracovní roztoky každého analytu zvlášť i směs všech studovaných analytů.

### **Zásobní roztok borátového pufru (1 M; 50 ml; pH 8,0)**

Navážka kyseliny borité: 3,0947 g

Navážka kyseliny borité byla rozpuštěna ve 45 ml vody za postupného přidávání NaOH koncentrovaného (ČL 2007) pro úpravu pH na 8,0. Rozpuštění bylo usnadněno působením ultrazvuku. Objem byl doplněn na 50 ml. Zásobní roztok byl uchováván v lednici po dobu jednoho měsíce.

### **Zásobní roztok FMOC-Cl (2,7 mM; 10ml)**

Navážka FMOC-Cl: 0,007 g

Pomocí ultrazvukové lázně byla navážka FMOC-Cl rozpuštěna v 10 ml acetonitrilu. Zásobní roztok byl uchováván v lednici v tmavé odměrné baňce.

### **Zásobní roztok kyseliny citronové (2 M; 25 ml)**

Navážka kyseliny citronové: 9,6065 g

Pomocí ultrazvukové lázně byla navážka rozpuštěna v 15 ml destilované vody a následně byl objem rozpouštědla doplněn do 25 ml. Roztok byl uchováván v lednici.

### **Roztok kyseliny mravenčí (2 M; 10 ml)**

870  $\mu\text{l}$  kyseliny mravenčí bylo v odměrné baňce doplněno do 10 ml vodou. Roztok byl uchováván v lednici.

### **Zásobní roztok glycinu (100 mM; 25 ml)**

Navážka: 0,187 g

Pomocí ultrazvukové lázně byla navážka rozpuštěna v 20 vody a doplněna do 25 ml. Roztok byl uchováván v lednici.

## 4.2.2 Příprava mobilní fáze (MF)

### Roztok kyseliny octové (20; 15 a 5 mM)

V odměrné baňce bylo k 180 ml vody přidáno množství kyseliny octové viz tabulka 11. Roztok byl doplněn do 200 ml a přefiltrován přes skleněnou fritu a filtr o velikosti pórů 0,22  $\mu\text{m}$ .

Tabulka 11

| Koncentrace připravovaného roztoku kyseliny octové | 20 mM             | 15 mM             | 5mM              |
|--|-------------------|-------------------|------------------|
| Objem kyseliny octové                              | 228 $\mu\text{l}$ | 171 $\mu\text{l}$ | 57 $\mu\text{l}$ |
| Celkový objem                                      | 200 ml            |                   |                  |

### Roztok kyseliny mravenčí (20; 10 a 5 mM)

V odměrné baňce bylo k 180 ml vody přidáno množství kyseliny mravenčí viz tabulka 12. Roztok byl doplněn do 200 ml a přefiltrován přes skleněnou fritu a filtr o velikosti pórů 0,22  $\mu\text{m}$ .

Tabulka 12

| Koncentrace připravovaného roztoku kyseliny mravenčí | 20mM                | 10mM               | 5mM                |
|--|---------------------|--------------------|--------------------|
| Objem kyseliny mravenčí                              | 174,1 $\mu\text{l}$ | 87,1 $\mu\text{l}$ | 43,5 $\mu\text{l}$ |
| Celkový objem  | 200 ml              |                    |                    |

## **4.3 Popis práce**

### **4.3.1 Optimalizace derivatizačního postupu**

Bylo nutné experimentálně stanovit vhodné podmínky derivatizační reakce s činidlem FMOC-Cl, abychom získali deriváty s nejvyšším možným výtěžkem. Za tímto účelem byly provedeny série experimentů, při nichž jsme měnili koncentraci derivatizačního činidla, teplotu a čas reakce, koncentraci a pH pufru a terminační činidlo derivatizační reakce. Reakce byla prováděna pro směs analytů i pro jednotlivé analyty zvlášť, aby mohla být ověřena jejich totožnost při chromatografickém stanovení a také vliv vícero sloučenin, jež by mohly reagovat s derivatizačním činidlem na výtěžnost derivatizační reakce.

#### **Optimalizace koncentrace derivatizačního činidla**

Ke 100  $\mu$ l pracovního roztoku metabolitů tyrosinu ve vialce bylo přidáno 100  $\mu$ l borátového pufru (pH 8,0; 1M) a 200  $\mu$ l zásobního roztoku derivatizačního činidla FMOC-Cl. Reakce probíhala 20 minut za míchání pomocí vortexu při laboratorní teplotě. Derivatizace byla ukončena přidáním kyseliny citronové (2 M).

#### **Optimalizace času reakce**

Optimalizace probíhala podle postupu Optimalizace koncentrace derivatizačního činidla s 200  $\mu$ l činidla FMOC-Cl (2,7mM) s třepáním po dobu 2, 5, 10, 20, 30, 60 a 120 minut. Reakce byla ukončena pomocí kyseliny citronové (2 M).

### **Optimalizace teploty reakce**

Optimalizace probíhala podle postupu Optimalizace koncentrace derivatizačního činidla a po přidání 200  $\mu\text{l}$  činidla FMOC-Cl (2,7 mM) se celá směs nechala třepat na Thermomixeru 10 minut při teplotách: 21 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C a 80 °C. Reakce byla ukončena přidáním 20  $\mu\text{l}$  kyseliny citronové (2 M).

### **Optimalizace pH borátového pufru**

Pro samotný průběh derivatizace je důležité mírně alkalické pH. Naše další experimenty proto směřovaly ke zjištění nejlepší hodnoty pH borátového pufru.

Optimalizace probíhala podle postupu Optimalizace koncentrace derivatizačního činidla s použitím borátového pufru o různém pH (7,0; 8,0; 9,0; 10,0). Po přidání 200  $\mu\text{l}$  FMOC-Cl (2,7 mM) se směs nechala reagovat na Thermomixeru při 40 °C. Po 15 minutách byla reakce ukončena přidáním kyseliny citronové (2 M).

### **Optimalizace koncentrace borátového pufru**

Pro derivatizaci byly připraveny čtyři roztoky borátového pufru (pH 8,0) o koncentraci 0,1 M; 0,25 M; 0,5 M; 1 M. Optimalizace probíhala podle postupu Optimalizace koncentrace derivatizačního činidla s následnou reakcí na Thermomixeru 15 minut při 40 °C po přidání 200  $\mu\text{l}$  FMOC-Cl (2,7 mM). Celý proces byl ukončen okyselením kyselinou citronovou (2 M).

## **Zastavení derivatizační reakce**

Pro dosažení opakovatelných výsledků analýzy bylo zapotřebí zajistit totožný reakční čas derivatizace našich analytů. Z tohoto důvodu bylo důležité ukončit derivatizaci ihned po třepání na Thermomixeru. Vzhledem k nutné přítomnosti mírně zásaditého prostředí pro průběh reakce bylo pro ukončení derivatizace možné zvolit okyselení vzorku, čímž jsme zamezili vzniku dalších derivátů. Na okyselení byly použity roztoky kyseliny citronové (2 M) a mravenčí (2 M). Další možností ukončení reakce bylo přidání sloučeniny s aminoskupinou v nadbytku, která zreagovala se zbylým činidlem FMOC-Cl. Pro naše pokusy byl zvolen roztok glycinu (100 mM).

### 4.3.2 Optimalizace HPLC systému

Pro stanovení derivátů katecholaminů byl zvolen HPLC systém s fluorescenční detekcí.

Pro pilotní experimenty byla vybrána C18 stacionární fáze typická pro reverzní systém. Konkrétně byla použita kolona Kinetex EVO C18 (150x3.0 mm) s velikostí částic 5  $\mu\text{m}$ , která byla dále vytemperována na 30 °C. Pro měření byla využita izokratická eluce s on-line mícháním mobilní fáze ze dvou samostatných pump. Průtoková rychlost mobilní fáze byla nastavena na 0,5 ml/min a nástřikový objem vzorku činil 10  $\mu\text{l}$ . Excitační a emisní vlnová délka byla u detektoru nastavena na hodnoty 263 nm ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) a 313 nm ( $\lambda_{\text{em}}$ ).

#### Optimalizace složení mobilní fáze

Pro účinnou separaci analytů bylo nutné zajistit vhodné složení mobilní fáze. Ta se skládala z vodné (A) a organické složky (B). Organickou fází v tomto případě tvořil acetonitril. Jako vodnou složku jsme nejprve zvolili roztok kyseliny octové viz tabulka 11 a později byla separace zkoušena i s kyselinou mravenčí viz tabulka 12. Optimalizován byl také poměr vodné a organické fáze.

#### Optimalizace stacionární fáze

Další optimalizovaným parametrem byla stacionární fáze a rozměry chromatografické kolony. V našich experimentech byly užity tři silikagelové kolony s navázanými C18 skupinami viz tabulka 13. Na jednotlivých kolonách bylo sledováno retenční chování derivátů katecholaminů.



Tabulka 13

| Typ kolony             | Rozměry kolony a velikost částic | Typ částic        | Výrobce    |
|------------------------|----------------------------------|-------------------|------------|
| <b>Kinetex EVO C18</b> | 150x3mm; 5 $\mu$ m               | Povrchově porézní | Phenomenex |
|                        | 100x3mm; 2,6 $\mu$ m             |                   |            |
| <b>Excel 3 C18</b>     | 100x3mm; 3 $\mu$ m               | Plně porézní      | ACE        |

### 4.3.3 Optimalizace extrakce

Pro extrakci našich analytů byly zvoleny čtyři organická rozpouštědla ethyl-acetát, dichlormethan, hexan a methyl-*terc*-butyl-ether (MTBE) viz tabulka 14. Do eppendorf mikroskopavky bylo napipetováno 400  $\mu$ l produktu derivatizace a dané organické rozpouštědlo v poměru 1:10. Poté se směs nechala třepat 10 minut na vortexu. Organická fáze byla odpařena proudem dusíku při 40 °C. Odparek byl rozpuštěn ve 400  $\mu$ l acetonitrilu a byl analyzován pomocí HPLC s fluorescenční detekcí. Extrakce byla využita pro přímou MS detekci derivátů viz kapitola 4.3.4.

Tabulka 14

| Rozpouštědla         | Log P | Relativní polarita | Mísitelnost s H <sub>2</sub> O | Mísitelnost s ACN |
|----------------------|-------|--------------------|--------------------------------|-------------------|
| <b>Dichlormethan</b> | 1,01  | 0,309              | -                              | +                 |
| <b>Ethyl-acetát</b>  | 0,29  | 0,228              | -                              | +                 |
| <b>Hexan</b>         | 3     | 0,009              | -                              | -                 |
| <b>MTBE</b>          | 0,96  | 0,124              | -                              | +                 |

#### 4.3.4 Určení derivátů katecholaminů pomocí hmotnostní spektrometrie

Na závěr jsme se pokusili ověřit strukturu jednotlivých derivátů katecholaminů pomocí iontové pasti v offline režimu, kdy byly jednotlivé deriváty analyzovány po přímém nástřiku stříkačkou do iontového zdroje. Pro naše měření byla použita hmotnostní spektrometrie v kladném ionizačním módu s ionizací pomocí elektrospreje (ESI+) viz tabulka 15.

Tabulka 15: Nastavení parametrů MS

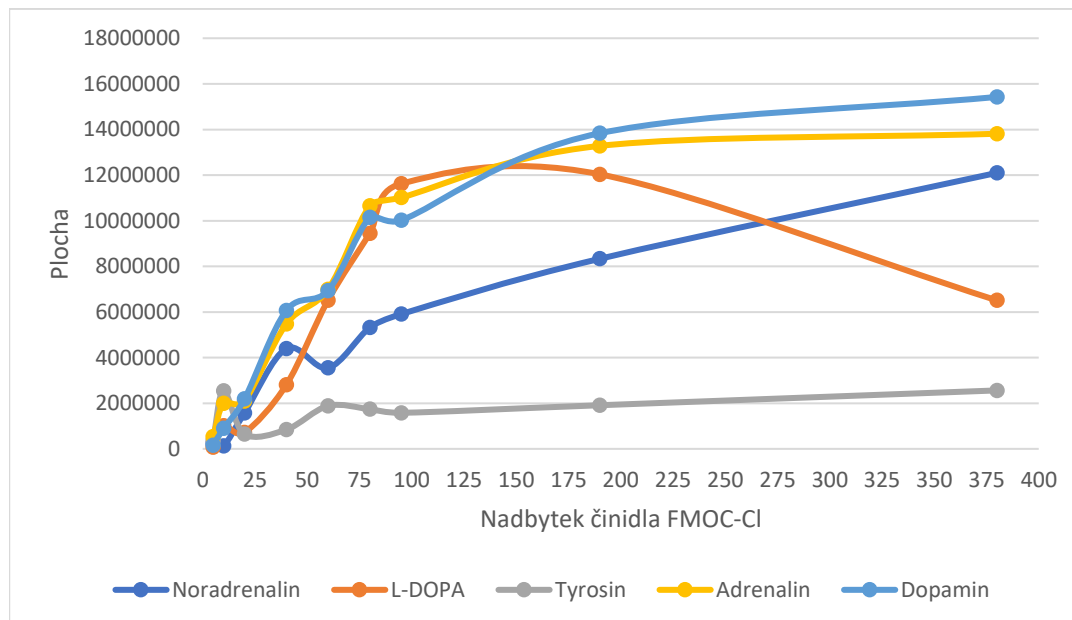
|                                      |        |
|--------------------------------------|--------|
| <b>Sheath Gas Flow Rate (arb)</b>    | 50     |
| <b>Aux/Sweep Gas Flow Rate (arb)</b> | 15     |
| <b>Spray Voltage (kV)</b>            | 3.30   |
| <b>Capillary Temp (°C)</b>           | 350.00 |
| <b>Capillary Voltage (V)</b>         | 3.00   |
| <b>Tube Lens Offset</b>              | -10.00 |

## 4.4 Výsledky a diskuse

### 4.4.1 Optimalizace koncentrace derivatizačního činidla

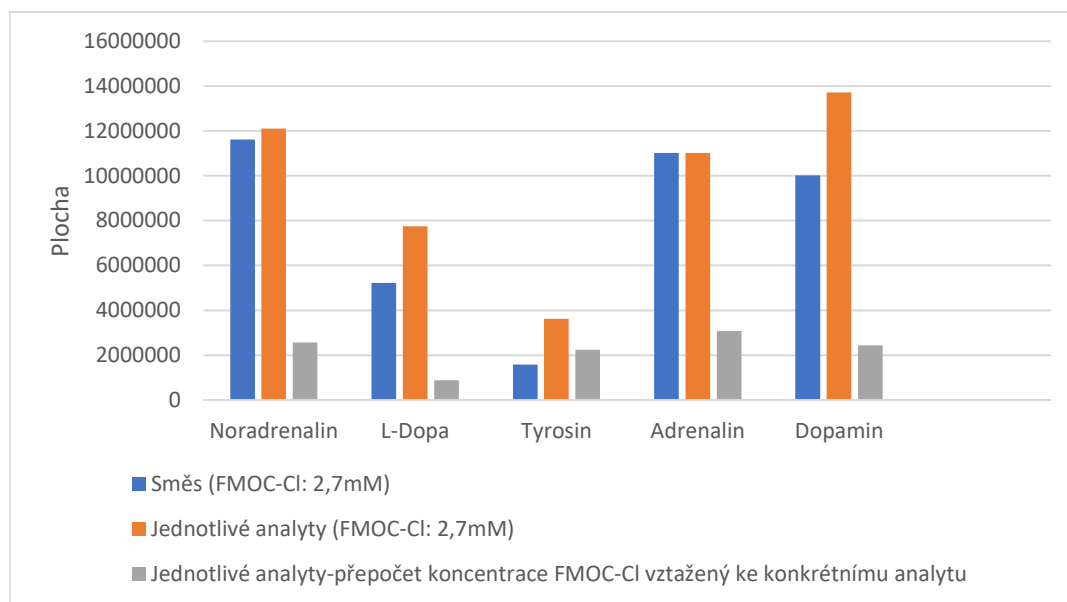
První experimentální pokusy byly zaměřeny na zjištění vhodného přídávku derivatizačního činidla FMOC-Cl. Pro určení optimální koncentrace FMOC-Cl při našich experimentech byl vždy použit zásobní roztok. Přičemž bylo nutné přepočítat potřebné množství roztoku pro jednotlivé analyty i jejich směs a následně doředit daným množstvím acetonitrilu. Násobek nadbytku přidaného derivatizačního činidla byl vyjádřen k 1 mM roztoku katecholaminů.

Z výsledků měření se, i vzhledem ke spotřebě činidla, jeví jako optimální užití 200  $\mu$ l FMOC-Cl (2,7 mM) viz Obrázek 6. S vyššími koncentracemi činidla byla již odezva relativně konstantní.



Obrázek 6: Graf zobrazující vliv nadbytku FMOC-Cl na výtěžnost reakce pro směs analytů

Dále bylo z měření zjištěno, že pro vysokou výtěžnost reakce je podstatná optimální koncentrace derivatizačního činidla, která však není závislá na koncentraci jednotlivých analytů ve vzorku viz Obrázek 7.



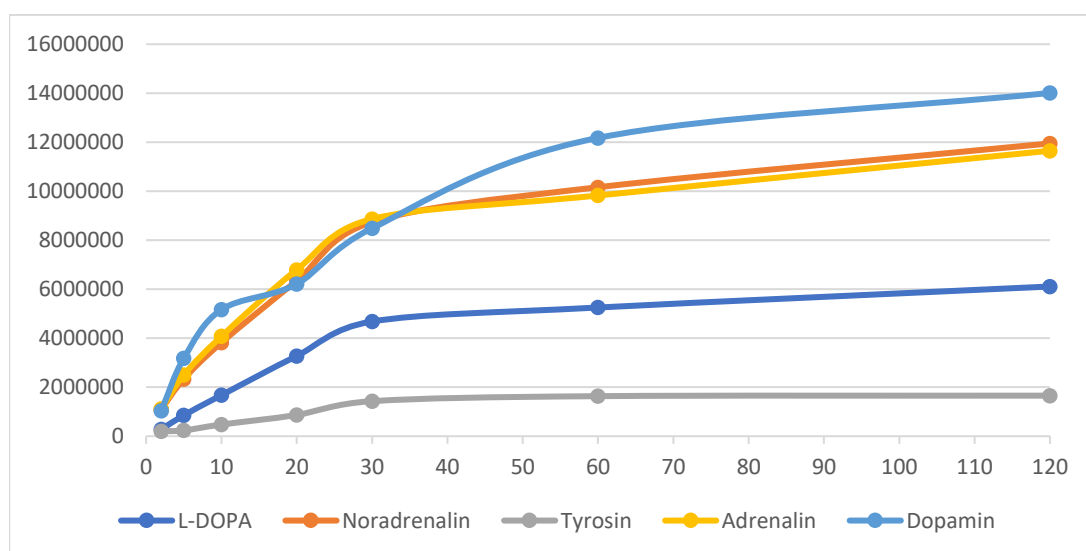
**Obrázek 7:** Graf zobrazující porovnání vlivu nadbytku FMOC-Cl na výtěžnost reakce pro jednotlivé analyty a pro směs těchto analytů

Experimenty byly prováděny pro jednotlivé analyty i jejich směs s přidavkem 200  $\mu$ l FMOC-Cl (2,7 mM), což odpovídá 95x nadbytku vztahenému ke koncentraci všech složek ve směsi. Dále byl zkoušen přidavek FMOC-Cl, který také odpovídal nadbytku 95x většímu, avšak tento nadbytek byl vztahen ke koncentraci konkrétního analytu ve směsi.

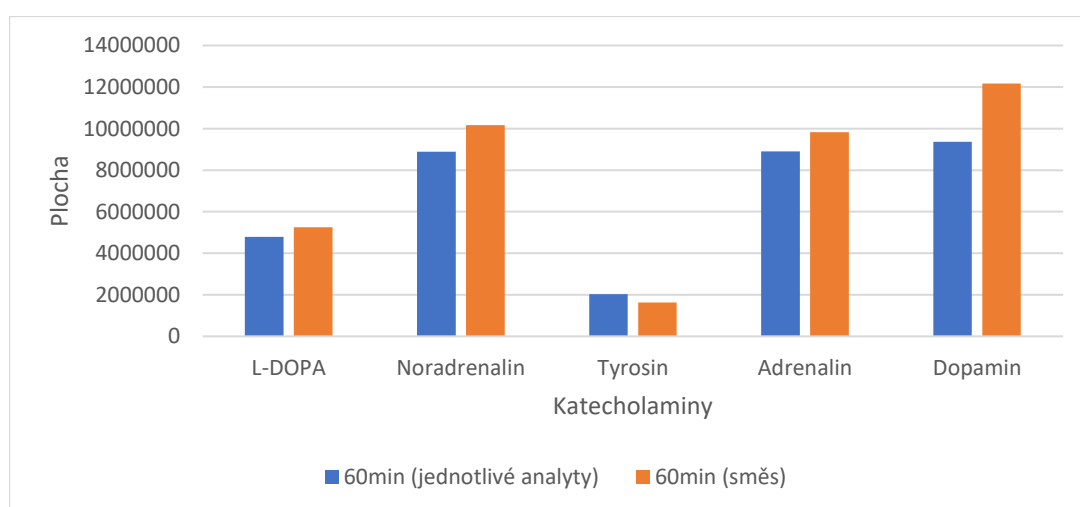
Na první pohled odlišné odezvy (Směs 2,7 mM a Jednotlivé analyty 2,7 mM) zejména u tyrosinu, dopaminu a L-DOPA byly zřejmě důsledkem nedokonale provedené derivatizace, která byla ve fázi vývoje a nebyla zde ještě prováděna terminace reakce. Velmi nízká odezva detektoru v pokusech s 95násobným nadbytkem FMOC-Cl k jednotlivým analytům ukazuje na to, že pro výtěžnost je důležitější celková koncentrace FMOC-Cl než její poměr k analytu.

#### 4.4.2 Optimalizace času derivatizační reakce

Pro další stanovení kvantitativního průběhu reakce bylo zapotřebí nechat derivatizaci probíhat při laboratorní teplotě v různých reakčních časech. S očekávaným pozitivním přínosem času na kvantitu reakce jsme nejlepších výsledků dosahovali s reakčním časem 60 min viz Obrázek 8. S dále se navyšujícím časem již nedocházelo k výraznému zvýšení odezvy.



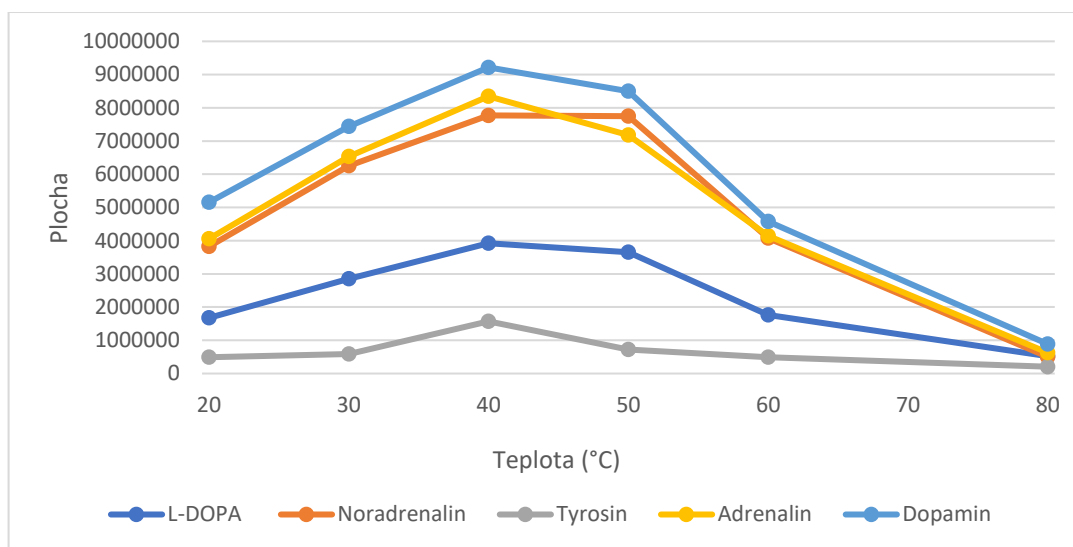
Obrázek 8: Graf zobrazující vliv času na výtěžnost reakce



Obrázek 9: Graf porovnávající vliv času na výtěžnost reakce pro jednotlivé deriváty katecholaminů a pro směs těchto derivátů

### 4.4.3 Optimalizace teploty derivatizace

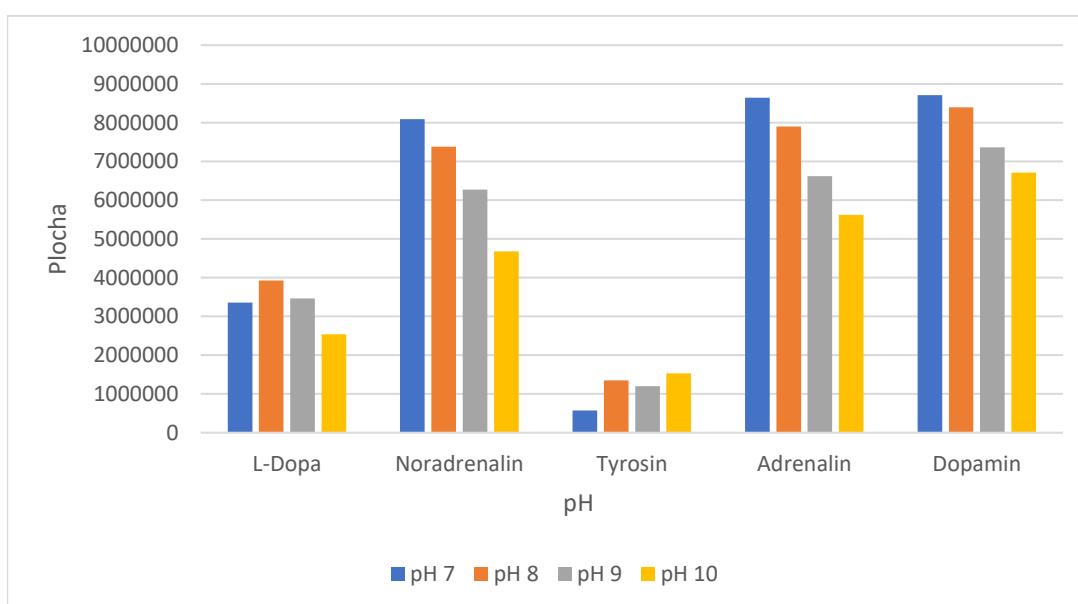
Vzhledem k očekávanému vlivu teploty na kinetiku reakce byly další pokusy prováděny za vyšších teplot. Z výsledků měření bylo zjištěno, že při vyšších teplotách dosáhneme totožných výtěžností, jako při experimentech prováděných za laboratorní teploty (60 min) s výrazným zkrácením reakčního času. Nejlepších hodnot dosáhneme při reakční teplotě 40 °C a času 15 min. Při vyšších teplotách odezva klesala a po ochlazení na laboratorní teplotu byla pozorována tvorba sraženiny viz Obrázek 10.



Obrázek 10: Graf zobrazující vliv teploty na výtěžnost reakce

#### 4.4.4 Změna pH borátového pufru

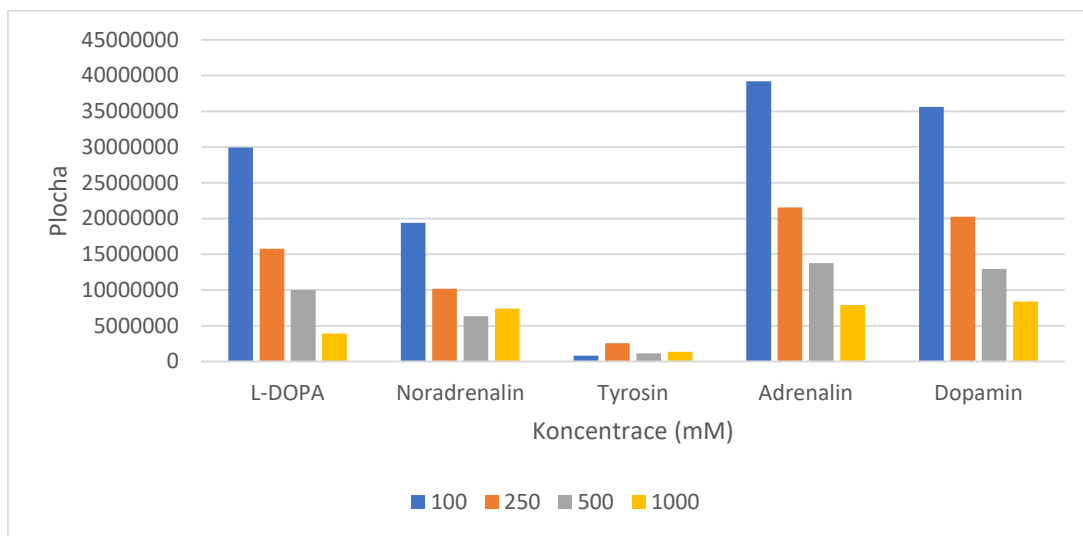
Z grafu 11 je patrné, že nejvyšší výtěžnosti u většiny analytů kromě tyrosinu a L-DOPA dosahovala derivatizace při pH pufru 7,0. Avšak vzhledem k velmi nízké výtěžnosti tyrosinu, která činila propad o 58 % oproti pH 8,0, bylo vyhodnoceno jako optimální a kompromisní pH 8,0. Další zvýšení hodnot pH mělo za následek snížení výtěžnosti u téměř všech analytů.



Obrázek 11: Graf zobrazující vliv pH pufru na výtěžnost reakce

#### 4.4.5 Změna koncentrace borátového pufru

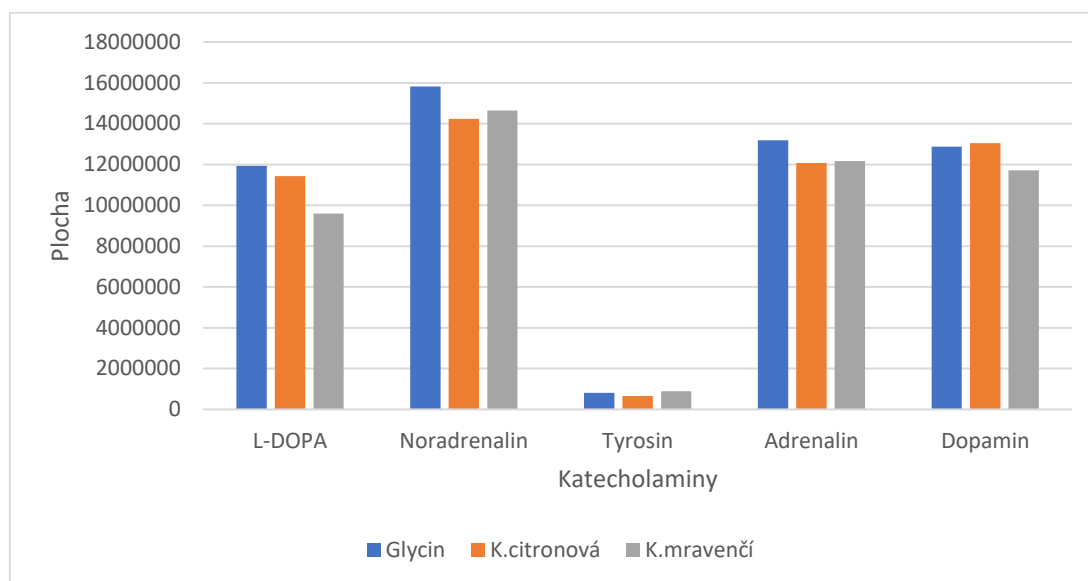
Experimentálně byl prokázán vliv koncentrace borátového pufru (pH 8,0) na výtěžnost derivatizace, přičemž nejlepších výtěžností z reakce bylo dosaženo s nižší koncentrací daného pufru viz Obrázek 12.



Obrázek 12: Graf zobrazující vliv koncentrace pufru na výtěžnost reakce



#### 4.4.6 Stanovení vhodného činidla pro ukončení derivatizace



Obrázek 13: Graf zobrazující potencionální činidla pro ukončení derivatizace

Všechna činidla vykazovala podobné výsledky a u všech jsme docílili terminace reakce.

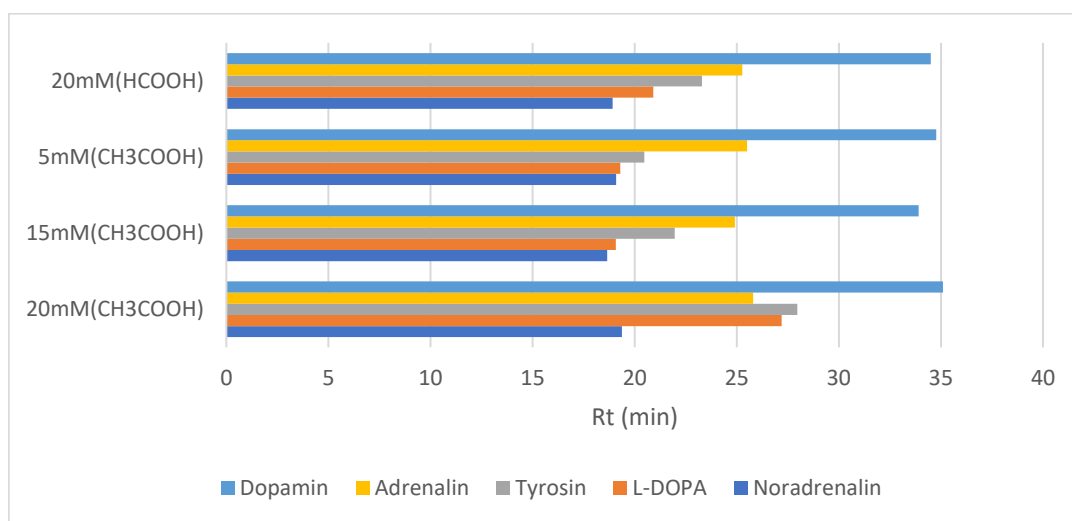
#### 4.4.7 Výsledné parametry reakce

Na přípravu derivatizace bylo nutné napipetovat 100  $\mu$ l pracovního roztoku metabolitů tyrosinu (1  $\mu$ g/ml) spolu se 100  $\mu$ l borátového pufru (0,1 M; pH 8,0) a protřepat směs na vortexu. Poté se k dané směsi přidalo 200  $\mu$ l činidla FMOC-Cl (2,7 mM) a reakce se nechala probíhat na Thermomixeru 15 minut při 40 °C a při otáčkách 1400 rpm. Derivatizace byla následně ukončena přidáním 20  $\mu$ l roztoku glycinu (100 mM), se kterým se vzorek nechal třepat ještě 10 minut při laboratorní teplotě.

## 4.4.8 Optimalizace chromatografie

### Optimalizace složení mobilní fáze

Experimenty byly provedeny s kolonou Kinetex EVO C18 (150x3.0 mm; 5  $\mu$ m) a s MF složenou z ACN a následně optimalizované vodné složky v poměru 68:32. Roztokem 20mM kyseliny octové jsme nedokázali docílit vhodné separace. Hlavní problém činila malá odezva tyrosinu a koeluce L-DOPA s tyrosinem. Proto jsme dále zkoušeli měnit koncentraci kyseliny (15 mM; 5 mM), ale i se změnou koncentrace jsme nedokázali docílit patřičných výsledků. Při nižších koncentracích docházelo ke koeluci noradrenalinu a L-DOPA. Separace všech látek na základní linii jsme dosáhli až při užití kyseliny mravenčí (20 mM) jako aditiva MF viz Obrázek 14.



Obrázek 14: Graf zobrazující vliv složení mobilní fáze na analýzu derivátů katecholaminů

## Optimalizace stacionární fáze

U většiny analýz je užíváno HPLC systému v reverzní fázi a stejně tak tomu bylo i při našich experimentech, kdy jsme volili silikagelové kolony s navázanými C18 skupinami. Jako MF byl použit roztok kyseliny mravenčí (20 mM) a ACN v poměru 32:68. Jednou z preferencí bylo dosáhnout účinné a rychlé separace viz tabulky 16, 17, 18. Toho bylo docíleno užitím kolon s core-shell částicemi.

### Kinetex EVO C18 (150x3.0 mm); 5 $\mu$ m

Úvodní experimenty byly prováděny na této koloně za podmínek uvedených v kapitole 4.3.2 Optimalizace HPLC systému. Jednotlivé retenční časy derivátů jsou uvedeny v tabulce 16.

Tabulka 16: Retenční časy, retenční faktor derivátů katecholaminů a NTP (Kinetex EVO C18 (150x3.0 mm); 5  $\mu$ m)

| Katecholamin | Rt (min) | <i>k</i> | NTP   |
|--------------|----------|----------|-------|
| L-DOPA       | 18,313   | 15,351   | 11731 |
| Noradrenalin | 21,256   | 17,979   | 12374 |
| Tyrosin      | 23,666   | 20,130   | 12702 |
| Adrenalin    | 28,597   | 24,533   | 12885 |
| Dopamin      | 39,37    | 34,152   | 14201 |

### Kinetex EVO C18 (100x3.0 mm); 2,6 $\mu$ m

Pro zkrácení doby naší analýzy byla použita kratší kolona s menšími core-shell částicemi. S touto kolonou jsou dosáhli výrazně nižších retenčních faktorů uvedených v tabulce 17.

Tabulka 17: Retenční časy, retenční faktor derivátů katecholaminů a NTP (Kinetex EVO C18 (100x3.0 mm); 2,6 μm)

| Katecholamin        | Rt (min) | <i>k</i> | NTP   |
|---------------------|----------|----------|-------|
| <b>L-DOPA</b>       | 10,866   | 12,284   | 11024 |
| <b>Noradrenalin</b> | 12,085   | 13,774   | 12930 |
| <b>Tyrosin</b>      | 13,487   | 15,487   | 15268 |
| <b>Adrenalin</b>    | 16,209   | 18,815   | 14906 |
| <b>Dopamin</b>      | 21,911   | 25,786   | 17046 |

### Excel 3 C18 (100x3.0 mm); 3 μm

Další zkoušená kolona byla Excel 3 C18 (100x3.0 mm); 3 μm. S touto kolonou nedocházelo snížení retenčního faktoru *k* oproti referenční koloně (C18 EVO; 150x3.0 mm, 5 μm). Naopak retenční faktor byl ještě vyšší – viz tabulka 18 –, a to z důvodu odlišné struktury použitých částic, které jsou v případě kolony Excel 3 C18 plně porézní.

Tabulka 18: Retenční časy, retenční faktor derivátů katecholaminů a NTP (Excel 3 C18 (100x3.0 mm); 3 μm)

| Katecholamin        | Rt (min) | <i>k</i> | NTP   |
|---------------------|----------|----------|-------|
| <b>Noradrenalin</b> | 19,71    | 23,363   | 5962  |
| <b>L-DOPA</b>       | 26,579   | 31,854   | 13950 |
| <b>Adrenalin</b>    | 28,883   | 34,702   | 14182 |
| <b>Tyrosin</b>      | 35,199   | 42,509   | 14052 |
| <b>Dopamin</b>      | 38,945   | 47,140   | 14141 |

Při porovnání našich použitých kolon se jako optimální jeví Kinetex EVO C18 (100x3.0 mm; 2,6 μm), se kterou jsme dosáhli optimální separace a zrychlení celé analýzy.

## Další optimalizace chromatografických podmínek

Pro experimenty byla užita kolona Kinetex EVO C18 (100x3.0 mm; 2,6 µm). Kromě délky kolony a velikosti částic jsme měnili i další parametry pro optimalizaci separace. Zvýšili jsme teplotu na koloně na 40 °C, což vedlo ke snížení retence a zúžení píků.

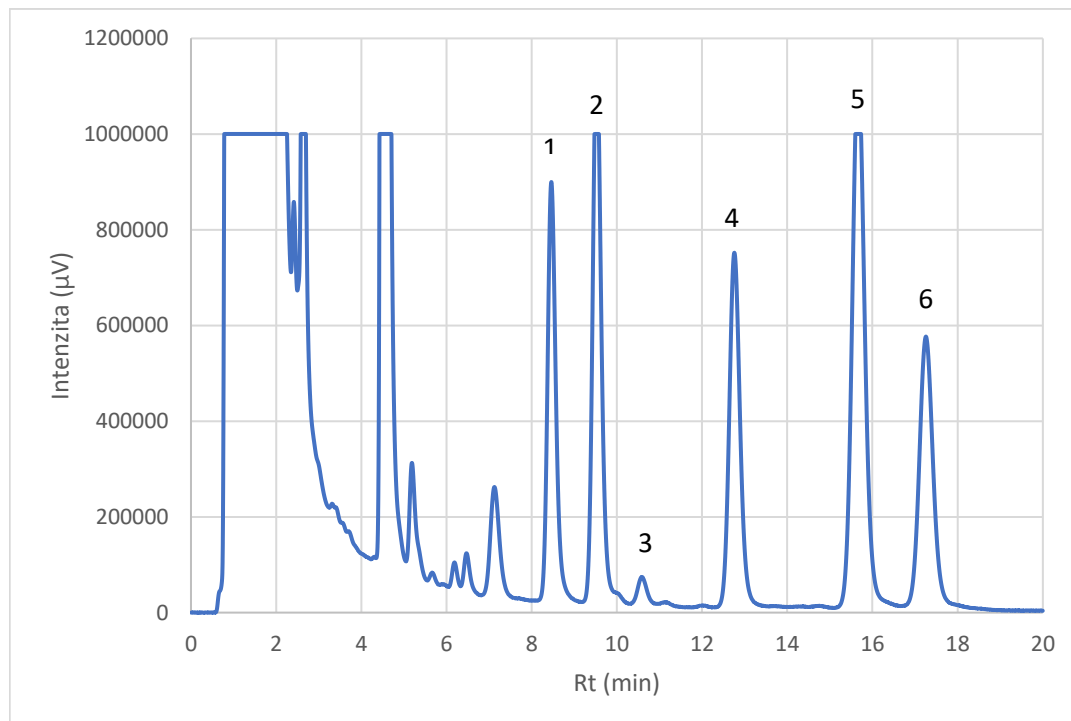
Posledním stanoveným parametrem byl objemový průtok. Zvětšení objemového průtoku opět vedlo k urychlení celé analýzy. Optimální objemový průtok činil 0,6 ml/min, kdy dosáhneme urychlení analýzy a zároveň zvýšením průtoku nedochází k výraznému snížení účinnosti při zachování rozumného tlaku u kolony Kinetex EVO C18 (100x3.0 mm); 2,6 µm – viz tabulka 19.

Tabulka 19: Porovnání účinnosti kolony při odlišném průtoku

|                     | <b>NTP (0,5 ml/min)</b> | <b>NTP (0,6 ml/min)</b> | <b>NTP (0,7 ml/min)</b> |
|---------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>L-DOPA</b>       | 11691                   | 11024                   | 10477                   |
| <b>Noradrenalin</b> | 13585                   | 12930                   | 12181                   |
| <b>Tyrosin</b>      | 15751                   | 15268                   | 13849                   |
| <b>Adrenalin</b>    | 15491                   | 14906                   | 13987                   |
| <b>Dopamin</b>      | 17521                   | 17046                   | 16337                   |

Tabulka 20: Finální optimalizované parametry HPLC s fluorescenční detekcí

|  |   |
|--|---|
| <b>Kolona</b>                                    | Phenomenex, Kinetex EVO C18<br>(100x3.0 mm); 2,6 µm   |
| <b>Teplota</b>                                   | 40 °C   |
| <b>Objemový nástřik</b>                          | 5 µl  |
| <b>Objemový průtok</b>                           | 0,6 ml/min  |
| <b>Zastoupení organické složky (ACN)</b>         | 68 %  |
| <b>Zastoupení vodné složky<br/>(HCOOH 20 mM)</b> | 32 %  |
| <b>Fluorescenční detektor</b>                    | 263 nm ( $\lambda_{ex}$ ) a 313 nm ( $\lambda_{em}$ ) |

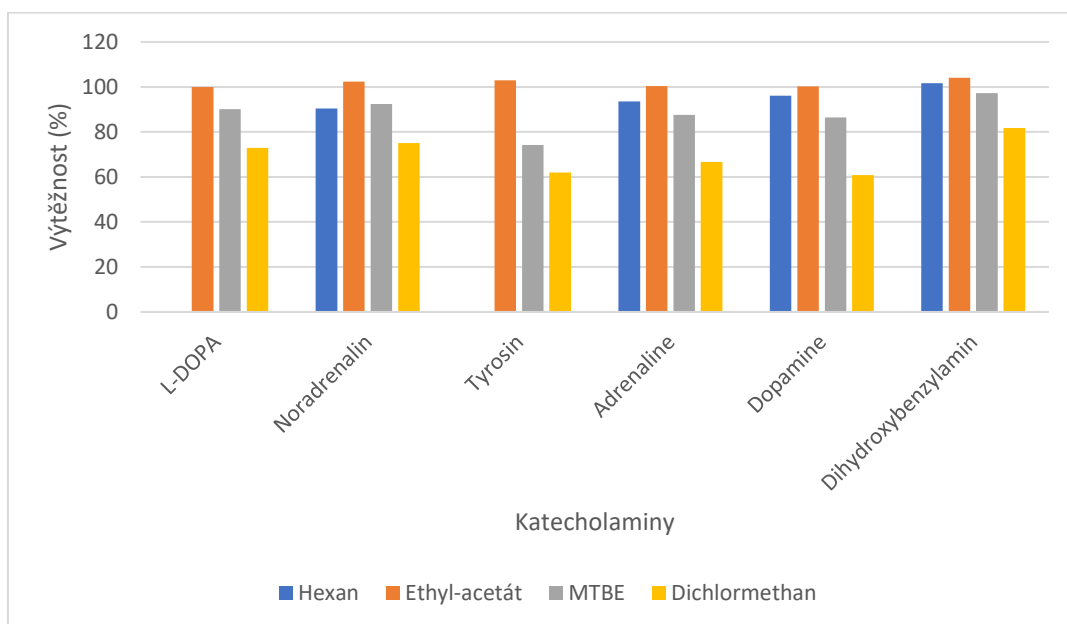


Obrázek 15: Výsledný chromatogram derivátů analytů

1-L-DOPA; 2-Noradrenalin; 3-Tyrosin; 4-Adrenalin; 5-Dihydroxybenzylamin;  
6-Dopamin

#### 4.4.9 Optimalizace extrakce

Vzhledem k nutnosti úpravy potencionálního vzorku biologického materiálu a také přečištění vzorku před charakterizací produktů pomocí MS bylo zapotřebí najít optimální extrakční postup, který byl modelově vyzkoušen na roztocích analytů a potenciálního vnitřního standardu dihydroxybenzylaminu po derivatizaci, tedy ne přímo na biologickém materiálu. Vzhledem k lipofilnějším vlastnostem produktů derivatizace, které jsou patrné z retence, byla pro extrakci zvolena extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE). Výtěžnost extrakce byla hodnocena jako poměr ploch analytů získaných po extrakci a před extrakcí v procentech. Nejlepších výsledků jsme dosahovali s užitím ethyl-acetátu, který při opakování extrakce dosahoval reprodukovatelných výsledků s minimální odchylkou viz tabulka 21. Ostatní činidla už vykazovala větší chybovost při opakovaných extrakcích a nedosahovala takové výtěžnosti. Při extrakci pomocí hexanu byla výtěžnost L-DOPA a tyrosinu nulová, což bylo způsobeno ionizací přítomné karboxylové skupiny ve struktuře analytů, značnou lipofilitou hexanu a také jeho nemísitelností s ACN viz Obrázek 16.



Obrázek 16: Graf zobrazující výtěžnosti extrakce pro jednotlivá extrakční činidla

Tabulka 21: Výčet směrodatných odchylek jednotlivých extrakčních činidel při opakovaní měření

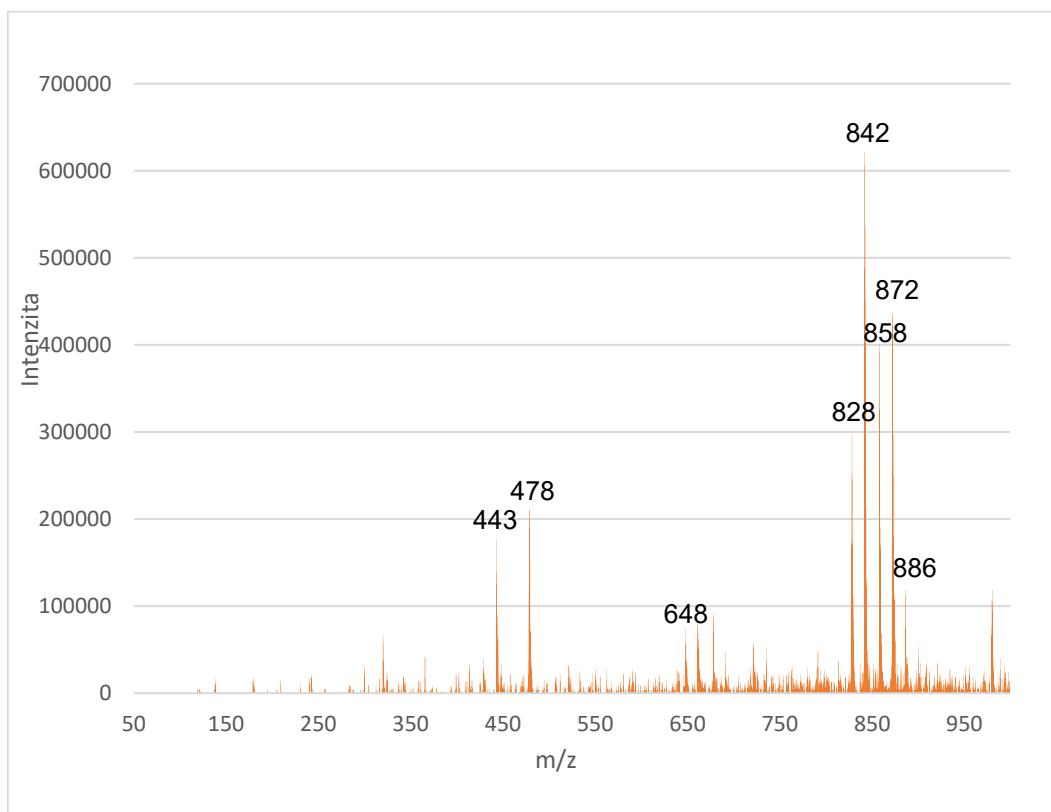
|                            | Hexan | Ethyl-acetát | MTBE  | Dichlormethan |
|----------------------------|-------|--------------|-------|---------------|
| <b>L-DOPA</b>              | 0     | 1,55         | 6,77  | 8,65          |
| <b>Noradrenalin</b>        | 5,16  | 0,75         | 6,87  | 8,58          |
| <b>Tyrosin</b>             | 0     | 5,21         | 13,82 | 5,22          |
| <b>Adrenalin</b>           | 1,96  | 0,69         | 5,66  | 7,41          |
| <b>Dopamin</b>             | 3,30  | 0,57         | 7,42  | 17,44         |
| <b>Dihydroxybenzylamin</b> | 0,78  | 0,53         | 1,74  | 5,06          |

Produkt po derivatizaci (400 µl) byl extrahován pomocí ethyl-acetátu (4 ml) v eppendorf zkumavce. Směs byla třepána 10 minut na vortexu a poté byla organická složka odpařena proudem dusíku při 40 °C. Následně byl odparek rozpuštěn ve 400 µl acetonitrilu.



#### 4.4.10 Určení derivátů pomocí MS

Za podmínek uvedených v kapitole 4.3.4 byl potvrzen vznik derivátů testovaných látek s činidlem FMOC-Cl viz Obrázek 17. Pomocí MS byl potvrzen předpoklad vzniku trisubstituovaných a disubstituovaných derivátů.



Obrázek 17: **Hmotnostní spektrum derivátů katecholaminů:**

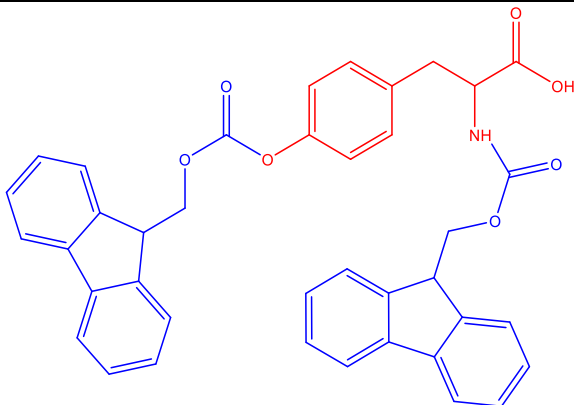
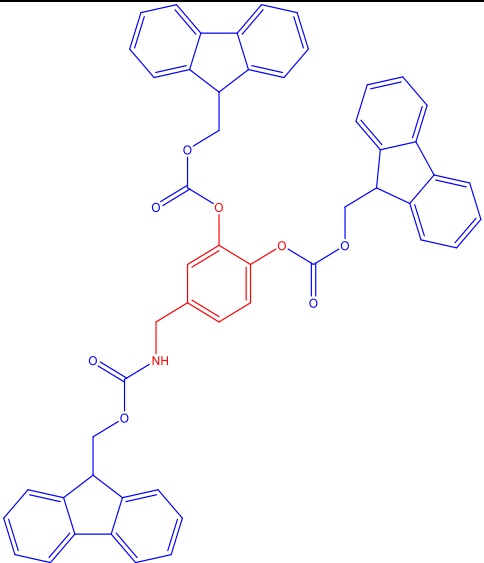
FMOC-adrenalin: 872; FMOC-noradrenalin: 858; FMOC-tyrosin: 648;

FMOC-dopamin: 842; FMOC-L-DOPA: 886;

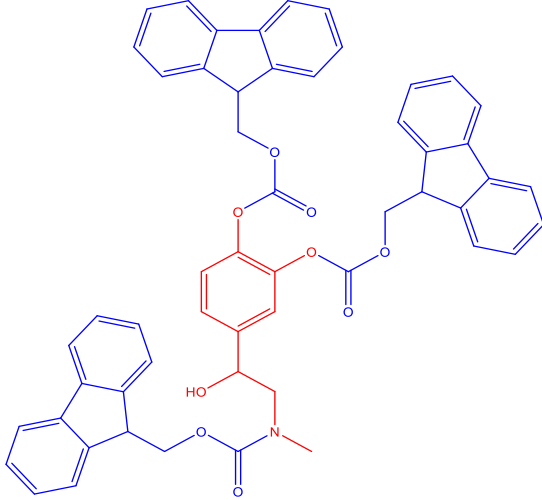
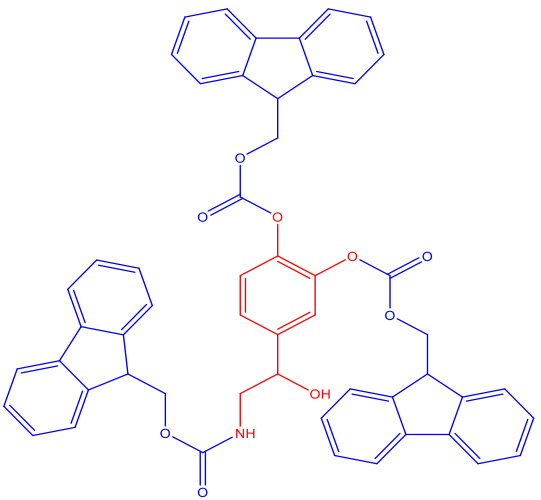
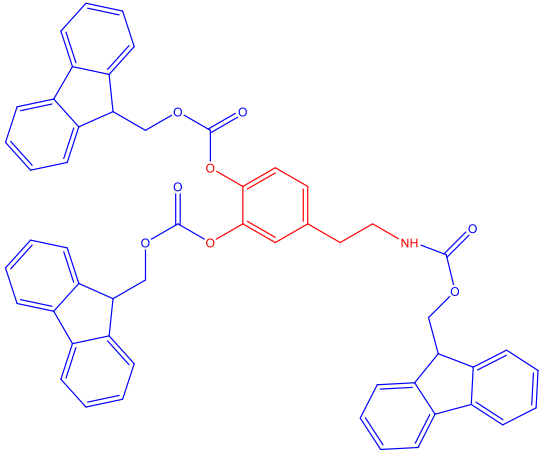
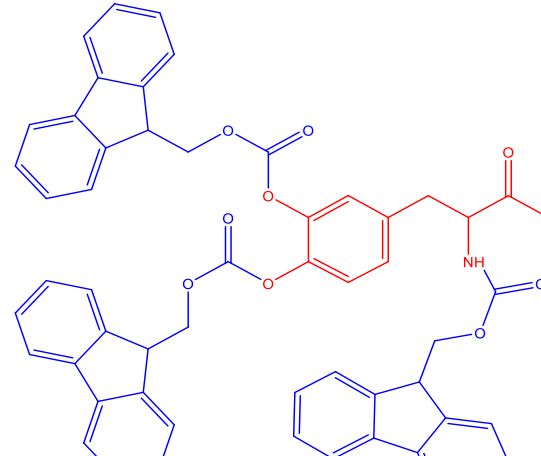
FMOC-dihydroxybenzylamin: 828

Předpokládaná struktura byla navržena v ChemDraw Professional viz tabulka 22. Pro všechny analyty byly pozorovány hmoty, které mají charakter  $[M+23]^+$  a tudíž je předpokládán vznik sodných aduktů ( $[M+Na]^+$ ).

Tabulka 22: Předpokládané struktury derivátů

| <b>Fmoc-Tyrosin</b>  |        | <b>Fmoc-Dihydroxybenzylamin</b>   |        |
|--|--------|---|--------|
| <b>Pozorovaná hmota (m/z)</b>  | 648,67 | <b>Pozorovaná hmota (m/z)</b>   | 828,87 |
| <b>Molekulová hmotnost</b>   | 625,68 | <b>Molekulová hmotnost</b>  | 805,88 |
|  |        |  |        |

Tabulka 22 pokračování

| <b>FMOC-Adrenalin</b>   |        | <b>FMOC-Noradrenalin</b>   |        |
|---|--------|--|--------|
| <b>Pozorovaná hmota (m/z)</b>   | 872,93 | <b>Pozorovaná hmota (m/z)</b>  | 858,90 |
| <b>Molekulová hmotnost</b>  | 849,94 | <b>Molekulová hmotnost</b>   | 835,91 |
|   |        |   |        |
| <b>FMOC-Dopamin</b>   |        | <b>FMOC-L-DOPA</b>   |        |
| <b>Pozorovaná hmota (m/z)</b>   | 842,90 | <b>Pozorovaná hmota (m/z)</b>  | 886,93 |
| <b>Molekulová hmotnost</b>  | 819,91 | <b>Molekulová hmotnost</b>   | 863,92 |
|  |        |  |        |

## 4.5 Závěr

Cílem diplomové práce byl vývoj a optimalizace metody stanovení metabolitů tyrosinu (L-DOPA, adrenalin, noradrenalin, dopamin) pomocí derivatizační reakce s následnou analýzou pomocí HPLC s fluorescenční detekcí.

Prvotní experimenty byly věnovány optimalizaci derivatizační reakce, kdy byl pozorován vliv jednotlivých parametrů (koncentrace FMOC-Cl, teplota reakce, reakční čas, pH a koncentrace borátového pufru) na výtěžnost z reakce uvedených v kapitole 4.4.

Dále byly stanoveny vhodné podmínky pro nastavení chromatografického systému. U MF byla zkoušena koncentrace a složení aditiv. Vhodné separace analytů na základní linii bylo dosaženo až při užití HCOOH jako aditiva. Po celou dobu optimalizace derivatizace byla užívána kolona KINETEX EVO C18 (150 x 3.0 mm, 5  $\mu$ m), se kterou čas analýzy činil 40 minut. Pro další optimalizaci separace a zrychlení analýzy byla použita kolona KINETEX EVO C18 (100 x 3.0 mm, 2,6  $\mu$ m). Díky zmenšení velikosti částic sorbentu, zkrácení kolony, zvýšení teploty na 40° a zvětšení objemového průtoku na 0,6 ml/min byla celková doba analýzy zkrácena na 19 minut.

Poslední fáze experimentální části byla věnována extrakci. Vzhledem k lipofilním vlastnostem derivátů byla prováděna LLE. Reprokovatelných výsledků bylo dosaženo s ethyl-acetátem, který vykazoval nejlepší výtěžnost a byly s tímto činidlem extrahovány všechny analyty. Na závěr byly potvrzeny předpokládané struktury derivátů metabolitů tyrosinu pomocí MS v kladném ionizačním módu, kdy byly analyty ionizovány elektrosprejem (ESI+). Navržené struktury jsou uvedené v kapitole 4.4.10.

## Seznam použitých zkratk

- ACN: Acetonitril
- APCI: Chemická ionizace za atmosférického tlaku
- APPI: Fotoionizace za atmosférického tlaku
- BZ-CL: Benzoyl chlorid
- ČL: Český lékopis
- DNS-CL: Dansyl chlorid
- ESI: Elektrosprejová ionizace
- FMOC-Cl: Fluorenylmethoxykarbonyl chlorid
- HILIC: Hydrofilní interakční chromatografie
- HIC: Hydrofobní interakční chromatografie
- HPLC: Vysokoučinná kapalinová chromatografie
- ICR: Iontová cyklotronová rezonance
- LIT: Lineární iontová past
- LLE: Extrakce z kapaliny do kapaliny
- MALDI: Ionizace desorpcí laserem za účasti matrice
- MF: Mobilní fáze
- MS: Hmotnostní spektrometrie
- MTBE: Methyl-*tert*-butyl-ether
- OPA: o-ftalaldehyd
- Q: Kvadrupól
- QqQ: Trojitý kvadrupól
- Rt: Retenční čas
- SF: Stacionární fáze
- SPE: Extrakce na pevnou fázi
- TOF: Analyzátor doby letu

## Citace

[1] Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2022, October 8). catecholamine. [online]. Encyclopedia Britannica.

<https://www.britannica.com/science/catecholamine>

[2] Biosyntéza katecholaminů. *Small Molecule Pathway Database* [online]. 2013 [cit. 2023-03-02]. Dostupné z:

[http://smpdb.ca/view/SMP0000012?highlight\[compounds\]\[\]=DB00135&highlight\[proteins\]\[\]=DB00135](http://smpdb.ca/view/SMP0000012?highlight[compounds][]=DB00135&highlight[proteins][]=DB00135)

[3] *Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém*. 2. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3460-9. s.7-12

[4] *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 2. Praha: GRADA PUBLISHING, 2018. ISBN 978-80-247-4157-4. s.117-122

[5] DOUŠA, Michal. *Derivatizace* [online]. [cit. 2023-01-08]. Dostupné z:

<http://www.hplc.cz/>

[6] *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Brno, 2021. ISBN 978-80-270-8559-0.

[7] Simultaneous Determination of Free Polyamines, Catecholamins and Metanephrines in Plasma and Urine. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* [online]. 2008, 2008, **31**, **2008**(14) [cit. 2023-01-08]. Dostupné z: doi:10.1080/1082620541802

[8] National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 4807, o-Phthalaldehyde. Retrieved March 14, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/o-Phthalaldehyde>.

[9] National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 7412, Benzoyl chloride. Retrieved March 14, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzoyl-chloride>.

[10] National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 11801, Dansyl chloride. Retrieved March 14, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dansyl-chloride>.

[11] Dansyl-chloride. *MedChemExpress* [online]. c 2013-2023 [cit. 2023-03-14]. Dostupné z: [https://www.medchemexpress.com/Dansyl-chloride.html?utm\\_source=google&utm\\_medium=CPC&utm\\_campaign=Europe&utm\\_term=HY-D0017&utm\\_content=Dansyl%20chloride&gclid=Cj0KCQjwtsCgBhDEARIsAE7RYh04sqCefrNA29Qe0z9HtS-MgSaP0HmomSPB11qNblFHS5DixwweDe8aAukXEALw\\_wcB](https://www.medchemexpress.com/Dansyl-chloride.html?utm_source=google&utm_medium=CPC&utm_campaign=Europe&utm_term=HY-D0017&utm_content=Dansyl%20chloride&gclid=Cj0KCQjwtsCgBhDEARIsAE7RYh04sqCefrNA29Qe0z9HtS-MgSaP0HmomSPB11qNblFHS5DixwweDe8aAukXEALw_wcB)

[12] KOVAŘÍKOVÁ, Petra a Ján STARIAT. *HPLC – STACIONÁRNÍ FÁZE A SEPARAČNÍ MÓDY* [online]. [cit. 2023-03-14]. Dostupné z: <https://dl1.cuni.cz/course/view.php?id=2904#section-4>

[13] SHIMADZU. *SHIMADZU Excellence in Science* [online]. [cit. 2023-02-28]. Dostupné z: [https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/fluorescence\\_detection.html](https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/fluorescence_detection.html)

[14] *Encyclopedia of Forensic Sciences* [online]. 2013. Elsevier, 2013 [cit. 2023-02-28]. ISBN 978-0-12-382165-2. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382165-2.00250-6> s.603-608

[15] SPE vs. LLE vs. SLE. *Phenomenex* [online]. Science Unfiltered, 2022 [cit. 2023-03-02]. Dostupné z: <https://phenomenex.blog/2022/02/22/spe-vs-lle-vs-sle/>

[16] *Food Process Engineering and Technology (Third Edition)* [online]. Academic Press, 2018 [cit. 2023-03-01]. ISBN 9780128120187. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812018-7.00011-7>. s.289-309

[17] KOVAŘÍKOVÁ, Petra a Ján STARIAT. *Využití HPLC v analýze léčiv v biologickém materiálu, úprava vzorku* [online]. [cit. 2023-03-14]. Dostupné z: <https://dl1.cuni.cz/course/view.php?id=2904#section-8>

[18] Huang, Xiaofen & Zhang, Qin & Li, Xianbo & Ao, Xianquan & Wang, Xuming. (2021). An HPLC Method for the Determination of Amines in Flotation Pulp Based on Derivatization. *Chromatographia*. 84. 10.1007/s10337-021-04020-3.

[19] Systém preparativní HPLC. In: *Wikipedie* [online]. 2010 [cit. 2023-01-19]. Dostupné z: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Preparative\\_HPLC.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Preparative_HPLC.svg)