

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Eva Durychová

Optimalizace stanovení 5-fluorouracilu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D.

Praha 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 15. 5. 2024

Eva Durychová

Poděkování

Na těchto pár řádcích bych chtěla poděkovat v první řadě svému školiteli doc. RNDr. Tomáši Křížkovi, Ph.D. za čas, který věnoval revizím tohoto díla a konzultacím nad samotným tvořivým procesem v laboratoři. Za druhé bych chtěla poděkovat členům své rodiny a blízkým přátelům, kteří měli tu trpělivost se mnou sdílet chvíle smutku, když se tvůrčí proces poněkud zadrhl a chvíle napětí při dokončování samotné práce.

Abstrakt

Diplomová práce se věnuje vývoji metody stanovení 5-fluorouracilu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie, která by mohla být použita ke stanovení účinnosti jeho enkapsulace liposomy.

Nejprve byla vyzkoušena separace 1 mM standardu 5-fluorouracilu na několika vybraných typech kolon. Mezi testované kolony patřila C18 kolona, C18 kolona s pozitivní úpravou povrchu, fenyl-hexylová kolona a několik fluorových kolon společně se dvěma HILIC kolonami. Jako mobilní fáze byla ze začátku používána směs skládající se z 10 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, $\text{pH} = 4,5$ a MeOH v poměru 98/2.

Výsledky ukázaly, že 5-fluorouracil eluuje na všech kolonách v přílišné blízkosti mrtvého času, kde často eluují také různé nečistoty. Aby se předešlo možnému zkreslení signálu 5-fluorouracilu ze strany nečistot potencionálně se vyskytujících v reálném vzorku, bylo vyzkoušeno několik různých obměn chromatografických podmínek.

Jako definitivně nejúčinnější se ukázalo přidání 5 mM iontově párového činidla (jmenovitě hydrátu chloridu tetrabutylamonného) do mobilní fáze společně se zvýšením pH na 8,0 pro podporu ionizace analytu. V kombinaci s takto upravenou mobilní fází dosahovala nejlepší výsledků fenyl-hexylová kolona s retenčním časem 4,36 minut, která byla vybrána i pro finální stanovení 5-fluorouracilu v reálných vzorcích liposomů.

Zoptimalizovaná metoda pro stanovení 5-fluorouracilu využívala kolonu Poroshell 120 Phenyl-hexyl ($100 \times 2,1$ mm; $2,7 \mu\text{m}$; 120 \AA) a mobilní fází skládající se z 10 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, $\text{pH} = 8,0$ + 5 mM hydrátu chloridu tetrabutylamonného a MeOH v poměru 98/2. Mez detekce této upravené metody byla stanovena na $4 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a mez kvantifikace na $14 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Na závěr byla tato zoptimalizovaná metoda otestována v praxi stanovením volného 5-fluorouracilu ve vzorcích čtyř druhů liposomů, u kterých byla na

základě zjištěných koncentrací spočítána účinnost enkapsulace pro zmíněný analyt.

Klíčová slova

vysokoučinná kapalinová chromatografie, iontově párová chromatografie, liposomy, 5-fluorouracil, UV-VIS detekce

Abstract

This thesis is dedicated to the development of a method for the determination of 5-fluorouracil by high-performance liquid chromatography, which could be used for determination of its encapsulation efficiency by liposomes.

First, separation of 1 mM standard of 5-fluorouracil was tested on several types of columns. Among tested columns belonged a C18 column, a C18 column with positive surface modification, a phenyl-hexyl column and several fluoride columns together with two HILIC columns. A mixture containing 10 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH = 4,5 and MeOH in the ratio of 98/2 was initially used as the mobile phase.

The results showed, that 5-fluorouracil elutes on all columns too close to the dead time, where different impurities often elute. To avoid possible distortion of 5-fluorouracil signal by impurities potentially occurring in the real sample, several adjustments of chromatographic conditions were tested.

The most effective solution was addition of 5 mM ion-pairing agent (namely tetrabutylammonium chloride hydrate) to the mobile phase, together with adjusting pH to 8,0 to support the ionization of the analyte. In the combination with mobile phase modified in this way, a phenyl-hexyl column with retention time 4,36 minutes reached the best result, therefore it was selected for the final determination of 5-fluorouracil in real liposome samples.

The optimized method for the determination of 5-fluorouracil used Poroshell 120 Phenyl-hexyl column ($100 \times 2,1$ mm; $2,7 \mu\text{m}$; 120 \AA) and a mobile phase of 10 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH = 8,0 + 5 mM tetrabutylammonium chloride hydrate and MeOH in a ratio of 98/2. The limit of detection of this adjusted method was $4 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ and limit of quantification $14 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

This optimized method was tested in practice by determining free 5-fluorouracil in samples of four types of liposomes, by which encapsulation efficiency for the analyte was calculated based on the observed concentration.

Key words

high-performance chromatography, ion-pair chromatography, liposomes, 5-fluorouracil, UV-VIS detection

Obsah

Seznam použitých zkratk a symbolů	11
1 Cíl práce	13
2 Teoretická část.....	14
2.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi.....	14
2.2 Hydrofilní interakční chromatografie	15
2.3 Iontově párová chromatografie	17
2.4 5-fluorouracil.....	19
2.5 Stanovení 5-fluorouracilu.....	19
2.5.1 Souběžné stanovení 5FU a paclitaxelu	22
2.5.2 Stanovení 5FU v lidské plazmě společně s U/UH2	22
2.5.3 Stanovení 5FU v přítomnosti jeho degradačních produktů	23
2.5.4 Stanovení 5FU v pracovním prostředí	23
2.5.5 Stanovení 5FU v lidské plazmě	24
2.6 Liposomy	25
2.6.1 Účinnost enkapsulace liposomů.....	26
3 Praktická část.....	28
3.1 Chromatografické podmínky	28
3.2 Chemikálie	28
3.3 Liposomy	28
3.4 Přístroje	29
3.5 Chromatografické kolony.....	29
4 Výsledky a diskuse.....	31
4.1 Základní měření na vybraných kolonách	31

4.1.1 C18 kolona	31
4.1.2 C18 kolona s pozitivně upraveným povrchem.....	32
4.1.3 Fenyl-hexylová kolona.....	33
4.1.4 CSH fluoro-fenyl kolona.....	33
4.1.5 Pentafluoro-fenyl kolona.....	35
4.1.6 BEH HILIC kolona	36
4.1.7 BEH HILIC amidová kolona	37
4.1.8 Základní srovnání retence 5FU na použitých kolonách.....	38
4.2 Zvýšení retence změnou chromatografických podmínek	39
4.2.1 Kyselina mravenčí v MF na C18 PS a HILIC BEH amidové koloně	39
4.2.2 Změna poměru složení MF na HILIC BEH amidové koloně	39
4.3 Použití iontově párového činidla.....	40
4.3.1 Optimální koncentrace iontově párového činidla	41
4.3.2 pH mobilní fáze při použití iontově párového činidla	42
4.4 Prodloužení retenčního času 5FU na testovaných kolonách po přidání iontově párového činidla do MF	43
4.4.1 Retenční čas 5FU na C18 koloně při použití iontově párového činidla	43
4.4.2 Retenční čas 5FU na C18 PS koloně při použití iontově párového činidla	44
4.4.3 Retenční čas 5FU na fenyl-hexylové koloně při použití iontově párového činidla	45
4.4.4 Retenční čas 5FU na HS F5 koloně při použití iontově párového činidla	46
4.5 Opakovatelnost a kalibrační závislost na dvou vybraných kolonách	48

4.5.1 Opakovatelnost, kalibrační závislost, LOD a LOQ fenyl-hexylové kolony	48
4.5.2 Opakovatelnost, kalibrační závislost, LOD a LOQ na HS F5 koloně50	
4.5.3 Konečný výběr kolony pro stanovení 5FU v přítomnosti liposomů..	52
4.6 Liposomy	53
4.7 Příprava vzorků k měření	54
4.8 Stanovení volného 5FU ve vzorcích	55
4.9 Ověření správnosti fungování metody v reálném vzorku	57
4.10 Účinnost enkapsulace	58
5 Závěr.....	58

Seznam použitých zkratek a symbolů

ACN – acetonitril

BEH – Bridged Ethylene Hybrid – hybridní částice s etylenovým můstkem

CSH – Charged Surface Hybrid – hybridní částice s nabitým povrchem

C18 – oktadecyl

C18 PS – oktadecylová kolona s pozitivní úpravou povrchu

DCP – dicetyl phosphate – dicetyl fosfát

DLPC – dilauryl phosphatidyl choline – dilauryl fosfatidyl cholin

DLPE – dilauryl phosphatidyl ethanolamine – dilauryl fosfatidyl etanolamin

DLPG – dilauryl phosphatidyl glycerol – dilauryl fosfatidyl glycerol

DMPE-2000 PEG – dimyristoyl glycerophosphoethanolamine

polyethylenglycolated – polyetylen glykolovaný dimyristoyl

glycerolfosfoetanolamin

DPPC – dipalmitoylphosphatidylcholine – dipalmitoylfosfatidylcholin

DPPG – dipalmitoylphosphatidylglycerol – dipalmitoylfosfatidylglycerol

DOPS – dioleoyl phosphatidylserine – dioleoyl fosfatidylserin

DSPC – distearoylphosphatidylcholine – distearoylfosfatidylcholin

DSPG – distearoylphosphatidylglycerol – distearoylfosfatidylglycerol

EE – Encapsulation Efficiency – účinnost enkapsulace

HILIC – Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography – hydrofilní interakční kapalinová chromatografie

HPLC – High Performance Liquid Chromatography – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IPC – Ion Pair Chromatography – iontově párová chromatografie

LLOQ – Lower Limit of Quantification – dolní mez kvantifikace

LOD – Limit of Detection – mez detekce

LOQ – Limit of Quantification – mez kvantifikace

$L_{1,2}$ – interval spolehlivosti

MeOH – metanol

MF – mobilní fáze

NBD-PC – phosphatidylcholine labeled with 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-y –
fosfatidylcholin značený 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-ylem

NMR – Nuclear Magnetic Resonance – nukleární magnetická rezonance

USP – United States Pharmacopeia – lékopis Spojených států amerických

PDA – Photo Diode Array – pole fotodiod

PEG – polyethylene glycol – polyetylen glykol

RP-HPLC – Reverse Phase HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s
obrácenými fázemi

RSD – Relative Standard Deviation – relativní směrodatná odchylka

SD – Standard Deviation – směrodatná odchylka

SF – stacionární fáze

TBAC – tetrabutylammonium chloride – chlorid tetrabutylamonný

UHPLC – Ultra-High Performance Liquid Chromatography – ultra účinná
kapalinová chromatografie

U/UH2 – poměr uracil/dihydrouracil

UV-VIS – ultrafialová a viditelná oblast

5-BU – 5-bromouracil

5-CU – 5-chlorouracil

5FU – 5-fluorouracil

1 Cíl práce

Cílem této diplomové práce je vyvinutí a optimalizace metody sloužící ke stanovení 5-fluorouracilu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. A to za účelem použití metody ke stanovení účinnosti enkapsulace 5-fluorouracilu liposomy.

2 Teoretická část

2.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi

Vysokoučinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi (RP-HPLC) je ve zkratce založena na interakci mezi molekulami analytu a alkylovými řetězci stacionární fáze. RP-HPLC využívá oproti HPLC s normálními fázemi polární mobilní fázi a nepolární stacionární fázi. Eluční síla mobilní fáze roste v opačném směru oproti HPLC s normálními fázemi a to tak, že roste s klesající polaritou organického rozpouštědla. Acetonitril (ACN) bude mít tedy větší eluční sílu než samotná voda (*Obr. 1*).¹

voda < methanol < acetonitril < propan-2-ol < dioxan < tetrahydrofuran

Obr. 1: Rozpouštědla používaná v RP-HPLC seřazená podle eluční síly.

Jako polární mobilní fáze jsou používány různé kombinace vodné složky (pufr, voda, zředěné roztoky kyselin a zásad) a polárního organického rozpouštědla mísitelného s vodou (alkoholy, ACN). Nepolární stacionární fáze používané v RP-HPLC jsou nejčastěji dlouhé uhlíkaté řetězce kovalentně vázané na silikagelu. Asi nejznámější nepolární stacionární fází je oktadecyl (C18). Přičemž na retenci látek má vliv délka a množství alkylových řetězců na stacionární fázi (SF). Se zvyšujícím se počtem alkylů a jejich narůstající délkou se retenční čas zadržované látky prodlužuje.¹

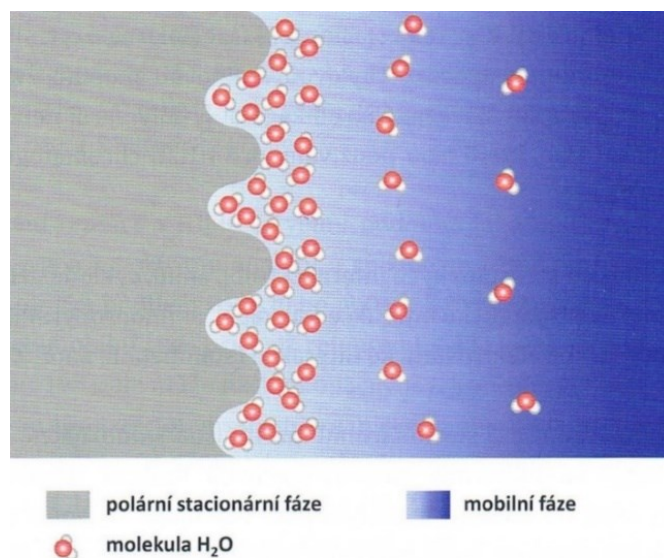
To, jak bude daná molekula v systému zadržována závisí na několika faktorech, jako jsou přítomné substituenty a celková polarita zadržované molekuly. V systému RP-HPLC jsou obecně zadržovány lépe látky nepolární. K vyšší retenci dále přispívá přítomnost vyššího počtu aromatických jader nebo halogenů ve struktuře dané látky. Velmi polární a iontové sloučeniny jsou zadržovány velmi slabě a mohou eluovat i v mrtvém objemu kolony. Popřípadě může docházet k deformaci a štěpení jejich chromatografických píků.¹

Na základě těchto skutečností by se mohlo zdát, že RP-HPLC lze použít jen u omezeného množství analytů, a to pouze u nedisociovaných nepolárních látek. Naštěstí pro chemický svět lze disociaci analytů ovlivnit správnou volbou pH mobilní fáze. Při kyselém pH budou slabé kyseliny nedisociovány a budou vykazovat tedy vyšší retenční časy. Obdobně se budou při vysokém pH zásadité látky vyskytovat ve své nedisociované formě a jejich retence bude tudíž také vyšší.¹

Výhodou RP-HPLC je její univerzálnost, která je schopná uspokojit poptávku od malých jednoduchých molekul až po složitější vzorky v podobě například rostlinných extraktů.¹

2.2 Hydrofilní interakční chromatografie

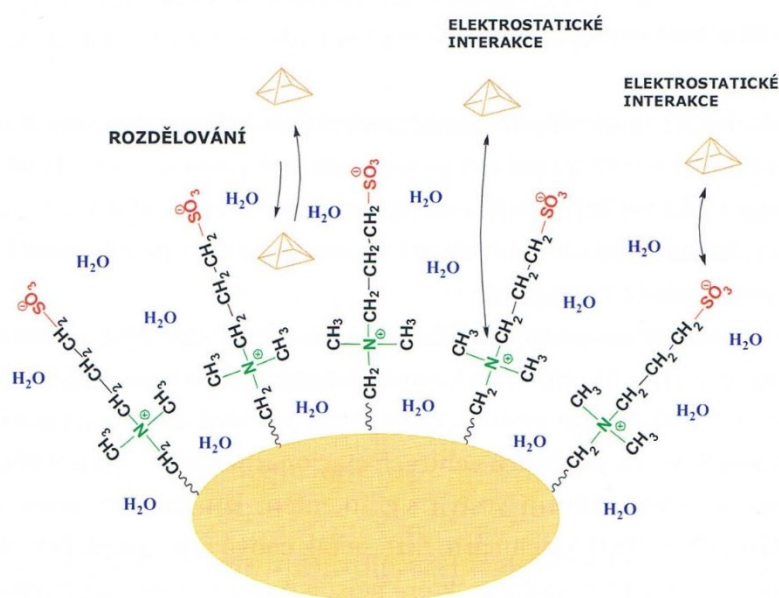
Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie se zkratkou HILIC (*angl. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) je charakterizována polární stacionární fází a relativně nepolární dvousložkovou mobilní fází (MF) složenou z organické složky (ACN) a vodné složky, která slouží jako silné eluční činidlo. Aby separace v HILIC systému mohla spolehlivě fungovat, neměl by podíl vodné složky v MF klesnout pod hranici 2,5 % a podíl organické složky pod 60 %.^{1,2}



Obr. 2: Vrstva vody vytvořená na stacionární fázi v systému HILIC. Upraveno a převzato z ¹.

Charakteristickým rysem HILIC je vytvoření úzké vrstvy vody na povrchu stacionární fáze (*Obr. 2*). K tomuto jevu dochází vlivem polarity SF, na níž se adsorbují polární molekuly vody obsažené ve dvousložkové MF.¹

Kvůli poměrné složitosti dějů, které se uplatňují při separaci v HILIC, je o jejím přesném mechanismu stále debatováno. A to i navzdory faktu, že je míra využití HILIC od konce 20. století stále na vzestupu. Mezi diskutované mechanismy separace patří rozdělování analytu mezi hydrofobní části MF a vrstvou vody vytvořenou na povrchu SF. Dalším diskutovaným mechanismem, který se uplatňuje v systému HILIC, je příspěvek vodíkových můstků a elektrostatických interakcí k celkovému mechanismu separace (*Obr. 3*).^{1,3}



Obr. 3: Mechanismy uplatňující se v systému HILIC. Převzato z ¹.

Polární stacionární fáze vystupující v HILIC je možné zařadit do tří skupin. Neutrální SF, mezi které patří například ty, které jsou modifikovány diolovými, amidovými nebo cyklodextrinovými skupinami. Tento typ SF při separaci neuplatňuje vliv elektrostatických interakcí. Další skupinou jsou nabitě SF, ke kterým patří silikagel, popřípadě silikagel modifikovaný aminopropylonovými skupinami. U těchto SF se do separačního procesu zapojují silné elektrostatické interakce, a proto jsou vhodné zejména při analýze kyselých analytů. Poslední skupinou HILIC stacionárních fází jsou zwitterionty, jako jsou například SF

modifikované sulfobetainovými skupinami. SF se zwitteriontovými funkčními skupinami uplatňují při separačním mechanismu jen slabé elektrostatické interakce a jsou proto, společně s neutrálními SF, vhodnější při analýze zásaditých analytů.^{1,3}

Retence analytu závisí tedy na použité SF, dále pak na složení a pH MF, a nakonec i na polaritě samotného analytu. Čím je analyt polárnějšího charakteru, tím je v systému HILIC více zadržován. Totéž platí pro jeho stupeň disociace. Čím je analyt více disociován, tím roste jeho retence v systému. Disociaci analytu lze ovlivnit úpravou pH mobilní fáze.¹

HILIC vyniká především v analýze polárních analytů. Navíc umožňuje použití vyšších průtoků MF a eventuální spojení s ionizací elektrosprejem v hmotnostní spektrometrii díky vysokému obsahu ACN v MF. Tato souhra možností analyzovat polární analyty s pomocí vysoce citlivé detekční metody nachází hojné uplatnění v bioanalytickém odvětví.¹

2.3 Iontově párová chromatografie

Základem iontově párové chromatografie (IPC) je přidání iontově párového činidla do systému založeného původně na separaci na reverzní fázi za účelem zlepšení separace iontových analytů, protože analyty iontového charakteru jsou z podstaty principu fungování RP-HPLC zadržovány jen velmi málo.⁴

Klíčovou vlastností iontově párového činidla je, že nese opačný náboj, než jaký má analyt. Navíc se jedná o látku s poměrně velkou nepolární částí. Její přidání do RP-HPLC systému má za následek vytvoření iontového páru s analytem, který je jako celek neutrální a oproti samotnému analytu také více nepolární. Tato změna analytu na více nepolární neutrální komplex má za cíl zlepšení jeho retence v RP-HPLC systému.⁴

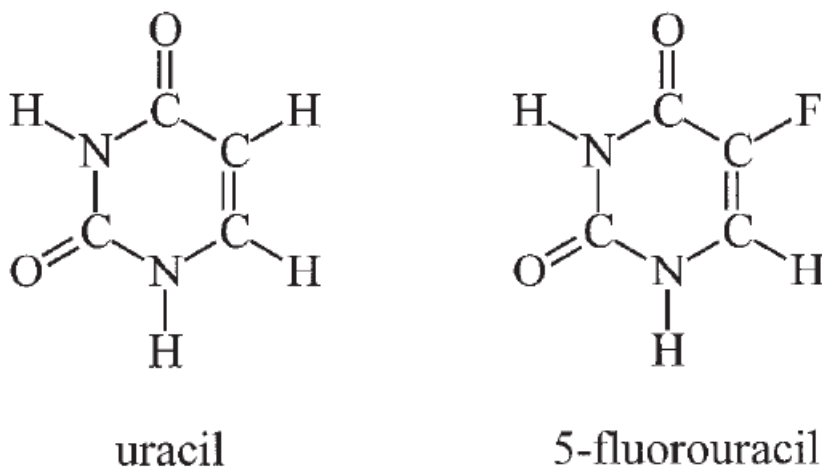
Iontově párová chromatografie nachází uplatnění nejen při zlepšení separace permanentně nabitých silných elektrolytů, ale také polárních slabých

elektrolytů. Pomocí vhodné úpravy pH mobilní fáze se docílí disociace analytu, který tak pak může tvořit iontový pár s iontově párovým činidlem.⁴

K separaci látek kationtového charakteru jsou používány sodné soli alkylsulfonových kyselin a pro separaci látek aniontového charakteru jsou používány N-alkyl kvartérní amoniové soli jako bromidy, sírany a chloridy.⁴

Retenci v iontově párové chromatografii lze ovlivnit množstvím přidaného iontově párového činidla. S rostoucí koncentrací iontově párového činidla se zadržování analytu v systému zlepšuje. Další faktor, který ovlivňuje míru retence v IPC je úprava pH mobilní fáze. Zvolení optimálního pH, při kterém analyt nejvíce disociuje logicky podporuje i vznik iontových párů. Posledním parametrem, kterým lze ovlivnit separaci v systému ICP, je vhodná velikost vybraného iontově párového činidla vzhledem k molekule analytu. Obecně platí, že se zvětšující se velikostí činidla, roste i retence analytu.^{1,4}

2.4 5-fluorouracil



Obr. 4: Uracil a fluorouracil. Převzato z ⁵.

5-fluorouracil (5FU) je heterocyklická aromatická sloučenina, která je analogem pyrimidinové báze uracilu (*Obr. 4*), lišící se záměnou vodíku na uhlíku C5 za atom fluoru. V pevném skupenství se jedná o bílý krystalický prášek bez známek zápachu. Z hlediska polaritý se jedná o vysoce polární látku s pK_a 8,02. Poprvé byl syntetizován v roce 1957.^{6, 7, 8}

Jedná se o významné léčivo používané při léčbě nádorových onemocnění. Účinkem patří mezi antimetabolická chemoterapeutika. Tedy léčiva, která zabraňují rakovinotvorným buňkám v jejich nadměrném dělení.⁹

Při intravenózním a intraperitoneálním podání se používá k léčbě rakoviny močového měchýře, prostaty, vaječníků, pankreatu a prsu. Topické podání slouží při léčbě některých kožních onemocnění jako například aktinové keratózy. Orální podání nebývá příliš časté a bylo zatím testováno jen při lokální léčbě rakoviny gastrointestinálního traktu.⁷

2.5 Stanovení 5-fluorouracilu

Ke stanovení 5FU se nejčastěji používá RP-HPLC. V kombinaci s ní se běžně využívá nukleární magnetická rezonance (NMR) a fluorescenční, hmotnostní a UV-VIS detektory. Mezi limity, na které zveřejněná HPLC stanovení

5FU narážejí, patří složitější chromatografické podmínky, nižší citlivost a nutnost použití většího množství vzorku. Z pohledu medicíny se k těmto problémům analytického chemika přidává i nerovnoměrné zastoupení maticí. Nejvíce zveřejněných studií se totiž věnuje měření hladin 5FU pouze v krevní plazmě a matrice jako moč nebo mozkomíšní mok jsou bohužel upozaděny.¹⁰

V souvislosti s analýzou složitějších vzorků (tedy i vzorků obsahujících liposomy) se objevuje navíc úskalí eluce 5FU v přílišné blízkosti mrtvého času kolony. To je způsobeno již zmíněnou vysokou polaritou 5FU a tím pádem slabou retencí na RP-HPLC. V blízkosti mrtvého času lze očekávat eluci nečistot, jejichž zaznamenané signály by tak mohly interferovat se signálem stanovovaného 5FU.

V následující tabulce (*Tab. 1*) jsou uvedena některá publikovaná stanovení 5FU, která jsou níže detailněji představená.

Tab. 1: Přehled publikovaných stanovení 5FU pomocí HPLC. Všechny kolony měly délku 250 mm a velikost částic 5 μm .

Název kolony	Vnitřní průměr [mm]	Teplota [°C]	Mobilní fáze	Nástřik [μl]	Průtok [$\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$]	Vnitřní standard	Absorban ce [nm]	Retenční čas [min]	LOD	LOQ/LLOQ	Citace
Venusil RP-C18	4,6	30	MeOH/0,5 % H_3PO_4 , gradient	50	1	-	266	4,3	0,6 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$	2 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$	11
RP-18 X-Terra	4,6	lab.	50 mM KH_2PO_4 , pH 5,0 + 0,1% TEA	-	0,4	5-BU*	254	12	2 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$	5 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$	12
C-18 RP Prodigy ODS3V	4,6	30	50 mM KH_2PO_4 , pH 5,0	-	1,2	-	254	6,0	-	-	13
LiChrospher 100 RP18	4,0	-	2% MeOH + 98 % 0,02 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 4,7	100	0,8	5-CU*	265	4,9	15 ng; 1 μg	30 ng; 3 μg	14
Diamonsil C18	4,6	40	MeOH/20 mM HCOONH_4 , gradient	20	0,8	5-BU*	265	6,2	-	5 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$	15

*5-BU – 5-bromouracil; *5-CU – 5-chlorouracil

2.5.1 Souběžné stanovení 5FU a paclitaxelu

Ve své metodě se *Chen a kol.*¹¹ snažili stanovit pomocí gradientové HPLC s PDA detektorem zároveň jak 5FU, tak i léčivo paclitaxel. V obou případech se totiž jedná o látky využívané často souběžně při léčbě rakoviny, které často figurují v klinických studiích. Jejich metoda splňuje požadavky validace kategorie I USP (lékopis Spojených států amerických; *angl. United States Pharmacopeia*).¹¹

Ke stanovení byla použita (Venusil RP-C18; 250 × 4,6 mm; 5 μm) C18 kolona udržovaná během analýzy na teplotě 30 °C. Mobilní fáze se skládala z methanolu a 0,5 % roztoku H₃PO₄. Vzorek byl aplikován nástřikem o objemu 50 μl a při průtoku 1 ml·min⁻¹.¹¹

Kalibrační křivka 5FU vykazovala lineární koncentraci, a to v rozmezí 0,2 – 40 μg·ml⁻¹ s korelačním koeficientem vyšším než 0,99990. Pro 5FU byla stanovena mez detekce (LOD; *angl. Limit of Detection*) 0,6 ng·ml⁻¹ a mez kvantifikace (LOQ; *angl. Limit of Quantification*) 2 ng·ml⁻¹. Retenční čas 5FU byl 4,3 min.¹¹

2.5.2 Stanovení 5FU v lidské plazmě společně s U/UH2

Metoda vyvinutá *Ciccolini a kol.*¹² si dala za cíl stanovit pomocí isokratické HPLC koncentraci 5FU a poměr uracil/dihydrouracil (*U/UH2*). Poměr *U/UH2* v plazmě slouží jako index stavu dihydropyrimidin dehydrogenasy. Eventuální vznik genového polymorfismu u tohoto enzymu může vést k přehnané citlivosti vůči 5FU.¹²

Ke stanovení byla použita kolona RP-18 X-Terra (250 × 4,6 mm; 5 μm) s přidanou C18 předkolonou. Analýza probíhala při laboratorní teplotě. Mobilní fáze byla složena z 50 mM KH₂PO₄, pH = 5,0 a 0,1% triethylaminu. Vzorek byl aplikován při průtoku 0,4 ml·min⁻¹ a 5-bromouracil byl použit jako vnitřní standard.¹²

Metoda byla citlivá a specifická pro 5FU v rozmezí 5–500 ng·ml⁻¹. Průměrný koeficient determinace byl 0,99955. Hodnota LOD byla stanovena na 2 ng·ml⁻¹ a hodnota LOQ na 5 ng·ml⁻¹. Retenční čas pro 5FU byl stanoven na 12 minut.¹²

2.5.3 Stanovení 5FU v přítomnosti jeho degradačních produktů

V rámci studie zabývající se stanovením 5FU v přítomnosti jeho degradačních produktů nebo jiných farmaceutických pomocných látek vyvinuli *Sinha a kol.*¹³ isokratickou HPLC metodu k jeho stanovení.¹³

Autoři metody použili kolonu C-18 RP Prodigy ODS3V (250 × 4,6 mm; 5 μm) udržovanou při měření na teplotě 30 °C. Mobilní fáze byla složena z 50 mM KH₂PO₄, pH = 5,0. Vzorek byl aplikován při průtoku 1,2 ml·min⁻¹.

Kalibrační křivka 5FU se pohybovala v rozmezí 10–100 μg·ml⁻¹. Koeficient determinace této kalibrační křivky byl 0,999. Retenční čas 5FU byl stanoven na 6 minut.

2.5.4 Stanovení 5FU v pracovním prostředí

Hlavním cílem *Micoli a kol.*¹⁴ bylo vyvinout jednoduchou a dostupnou analytickou metodu stanovení 5FU v prostředí, ve kterém jsou připravována chemoterapeutická léčiva. Jednalo se tak o stanovení 5FU v enviromentálních matricích, jakými jsou například rukavice, filtry a utěrky.¹⁴

Byla použita kolona LiChrospher 100 RP18 (250 × 4,0 mm; 5 μm) s C18 předkolonou. Autoři zvolili isokratickou eluci pomocí mobilní fáze skládající se z 2% MeOH a 98% 0,02 mM CH₃COONH₄ o pH 4,7. Vzorek o objemu 100 μl byl aplikován do systému s průtokem 0,8 ml·min⁻¹. Jako vnitřní standard byl použit 5-chloruracil.¹⁴

Kalibrační křivka u vzorků obsahujících zachycený 5FU ze vzduchu se pohybovala v rozmezí 15–480 μg a u stěrkových vzorků v rozmezí 1–32 μg. Zjištěná LOD pro vzorky s 5FU zachyceným ze vzduchu byla stanovena na 15 ng

a pro stěrkové vzorky na 1 μg . LLOQ (dolní mez detekce; *angl. Lower Limit of Quantification*) vzorků obsahujících ze vzduchu zachycený 5FU byla 30 ng a stěrkových vzorků 3 μg . Retenční čas 5FU byl 4,86 minut.¹⁴

2.5.5 Stanovení 5FU v lidské plazmě

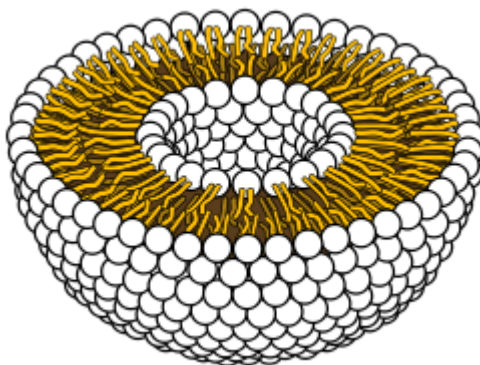
*Gu a kol.*¹⁵ vyvinuli gradientovou HPLC metodu s cílem určení hladiny 5FU v lidské krevní plazmě.

Byla zvolena C18 kolona (Diamonsil C18; 250 \times 4,6 mm; 5 μm), která byla po čas experimentu udržována při teplotě 40 $^{\circ}\text{C}$. Mobilní fáze byla složena z MeOH a 20 mM HCOONH₄. Vzorek o objemu 20 μl byl aplikován do systému při průtoku 0,8 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Jako vnitřní standard byl použit 5-bromouracil.¹⁵

Hladina koncentrací v kalibrační závislosti byla v rozmezí 5–500 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ a její koeficient determinace nebyl menší než 0,992. LLOQ 5FU byla stanovena na 5 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ a retenční čas na 6,2 minuty.¹⁵

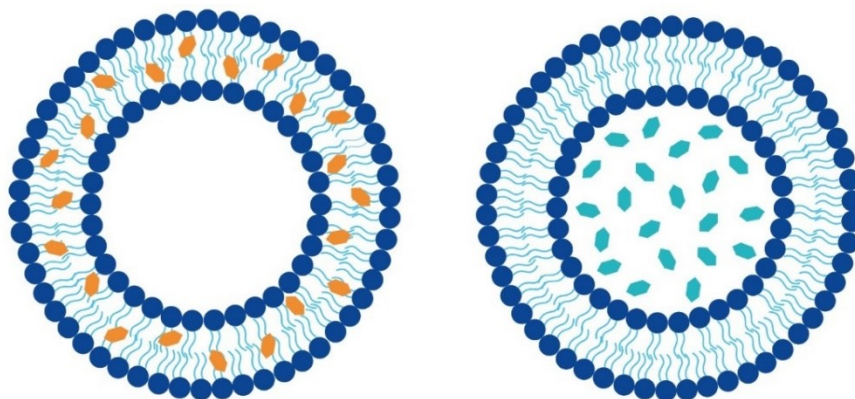
2.6 Liposomy

Liposomy jsou nanočástice kulovitého tvaru s dutým jádrem složené z jedné, popřípadě několika dvojvrstev fosfolipidů. Jedná se v podstatě o analog buněčné membrány, kdy hydrofilní části fosfolipidů tvořící dvojvrstvu směřují ven a dovnitř vytvořeného tělesa (*Obr. 5*).¹⁶



Obr. 5: Struktura liposomu. Převzato z ¹⁷.

Díky skutečnosti, že se uprostřed liposomů nachází dutý prostor je možné je využít jako nosiče různých hydrofilních látek uvnitř organismu. I hydrofobní látky mohou být liposomy transportovány a to tak, že budou zahrnuty uvnitř jejich membrány (*Obr. 6*). Oproti nanočásticím založeným na polymerech mají liposomy větší fyziologickou biokompatibilitu, protože se ve své podstatě značně podobají buněčným membránám. O liposomech jako nosičích léčiv se poprvé začalo uvažovat v devadesátých letech dvacátého století. Bohužel je uvedení do klinické praxe brzděno nedostatky liposomů na poli jejich stability.¹⁶



Obr. 6: Liposom jako nosič hydrofobní (vlevo) a hydrofilní (vpravo) látky. Převzato a upraveno z ¹⁸.

Liposomy v roli přenašečů jsou užitečné pro přenos nestabilních látek, u kterých hrozí jejich degradace, a tím pádem ztráta či snížení jejich požadovaných vlastností. Dále jsou například využívány pro transport chemoterapeutických léčiv, u kterých zlepšují jejich farmakokinetické vlastnosti a snižují nežádoucí účinky. Své místo si liposomy našly i na poli kontrastních látek používaných při ultrazvuku (Definity[®], SonoVue[®]) nebo ve vakcínách (Epaxal[®], Inflexal V[®]).^{16,19}

Prvním léčivem využívajícím technologii liposomů, které bylo oficiálně schváleno autoritami, byl Doxil[®] známý též pod názvem Caelyx[™] v roce 1995. Enkapsulovanou účinnou látkou byl v tomto případě doxorubicin, který se používá při léčbě rakoviny prsu, močového měchýře, vaječníků, plic a také při léčbě leukémie a lymfomů.^{19,20}

Mezi nejběžněji používané fosfolipidy využívané k tvorbě liposomů patří například dilauryl fosfatidyl cholin (DLPC), dilauryl fosfatidyl etanolamin (DLPE), dilauryl fosfatidyl glycerol (DLPG), dioleoyl fosfatidylserin (DOPS) a dicetyl fosfát (DCP). Pro zlepšení stability liposomů a zabránění jejich agregaci je do jejich struktury přidáván cholesterol. Stabilita může být navíc ještě zlepšena úpravou povrchu pomocí polyetylen glykolu (PEG).^{16,19}

2.6.1 Účinnost enkapsulace liposomů

Jedním z parametrů popisujících vlastnosti liposomů je účinnost enkapsulace (EE; *angl. Encapsulation Efficiency*). Tento parametr vyjadřuje v procentech množství látky, které jsou liposomy schopny enkapsulovat a následně dopravit na místo určení. Účinnost enkapsulace může být stanovena buď přímou nebo nepřímou metodou.²¹

$$EE = \frac{E_{\text{látky}}}{T_{\text{látky}}} \cdot 100 [\%]$$

Vzorec 1: Výpočet pro přímé stanovení účinnosti enkapsulace. Upraveno a převzato z²¹.

Přímá metoda (*Vzorec 1*) využívá pro výpočet enkapsulace dva parametry. Prvním je množství látky enkapsulované liposomy ($E_{\text{látky}}$) a druhým množství látky přidané při přípravě liposomů ($T_{\text{látky}}$).

$$EE = \frac{\text{celkové množství látky} - \text{množství volné látky}}{\text{celkové množství látky}} \cdot 100 [\%]$$

Vzorec 2: Výpočet pro nepřímé stanovení účinnosti enkapsulace. Převzato a upraveno z ²².

Pro výpočet účinnosti enkapsulace nepřímou metodou (*Vzorec 2*) je nutné znát celkové množství látky, které bylo použité při přípravě liposomů a množství volné látky, které nebylo liposomy enkapsulováno. Právě touto nepřímou metodu byla stanovena účinnost enkapsulace 5FU liposomy v rámci této práce.

3 Praktická část

3.1 Chromatografické podmínky

V rámci procesu optimalizace metody byly testovány různé chromatografické podmínky, které jsou blíže popsány v příslušných kapitolách v části Výsledky a diskuse. Níže jsou uvedeny podmínky optimalizované metody.

- Vlnová délka detekce: 265 nm
- Průtok: 0,3 ml·min⁻¹
- Nástřik: 1 µl
- Teplota kolony: 25°C
- MF: 10 mM CH₃COONH₄, pH = 8,0 s příměsí 5 mM hydrátu chloridu tetrabutylamonného/MeOH v poměru 98/2

3.2 Chemikálie

- Amoniak – vodný roztok, Lach:ner, Česká republika
- Kyselina octová, 99% P.A, Lach:ner, Česká republika
- Kyselina mravenčí, pro LC-MS, Fluka, Švýcarsko
- Methanol; 99%, Thermo Fisher Scientific, USA
- Acetonitril; ≥99,9%, VWR Chemicals, USA
- Hydrát chloridu tetrabutylamonného, 98%, Sigma-Aldrich, USA
- 5-fluorouracil, >99%, Sigma-Aldrich, USA
- Deionizovaná voda připravená systémem Milli-Q, Millipore, USA

3.3 Liposomy

Již připravené vzorky liposomů byly darovány skupinou prof. Františka Štěpánka z Ústavu chemického inženýrství VŠCHT Praha. Liposomy byly připraveny rozpuštěním lipidů ve směsi chloroform:methanol v poměru 2:1. Po

rozpuštění lipidů následovalo odpaření směsi rozpouštědel v rotační vakuové odparce. Vzniklý lipidový film byl rehydratován 5 mM fosfátovým pufrem (pH 7,10) a 21krát protlačen v extrudéru přes membránu o velikosti pórů 100 nebo 400 nm. Použité vzorky liposomů měly následující složení:

- DPPC:DPPG: DMPE-2000 PEG 100 nm (80:18:2)
- DPPC:DPPG: DMPE-2000 PEG 400 nm (80:18:2)
- DSPC:DSPG: DMPE-2000 PEG 400 nm:NBD-PC (75:22:3:0,5)
- DSPC:DSPG: DMPE-2000 PEG 120 nm:NBD-PC (75:22:3:0,5)

3.4 Přístroje

- 1260 Infinity HPLC, Agilent Technologies, Německo
- ACQUITY UPLC H-Class, Waters Corporatin, USA
- Ultrazvuková lázeň Elma S15, Elmasonic, Německo
- Analytické váhy 262 SMA-FR, Precisa, Švýcarsko
- Stolní centrifuga Eppendorf MiniSpin, Eppendorf, Německo
- 3540 pH & conductivity meter, Jenway, Velká Británie
- Stříkačkové filtry, 4 mm Single Use Filter Device, 0,2 μm PVDF Membrane, Polypropylene Housing, Whatman, Velká Británie

3.5 Chromatografické kolony

- Poroshell 120 SB-AQ (100 \times 2,1 mm; 2,7 μm ; 120 Å) Agilent Technologies, Německo
- Kinetex® 2,6 μm PS C18 (100 \times 2,1 mm; 2,6 μm ; 100 Å) Phenomenex, USA
- Poroshell 120 Phenyl-hexyl (100 \times 2,1 mm; 2,7 μm ; 120 Å) Agilent Technologies, Německo
- Discovery® HS F5 (150 \times 4,6 mm; 5,0 μm ; 120 Å) Sigma-Aldrich, USA

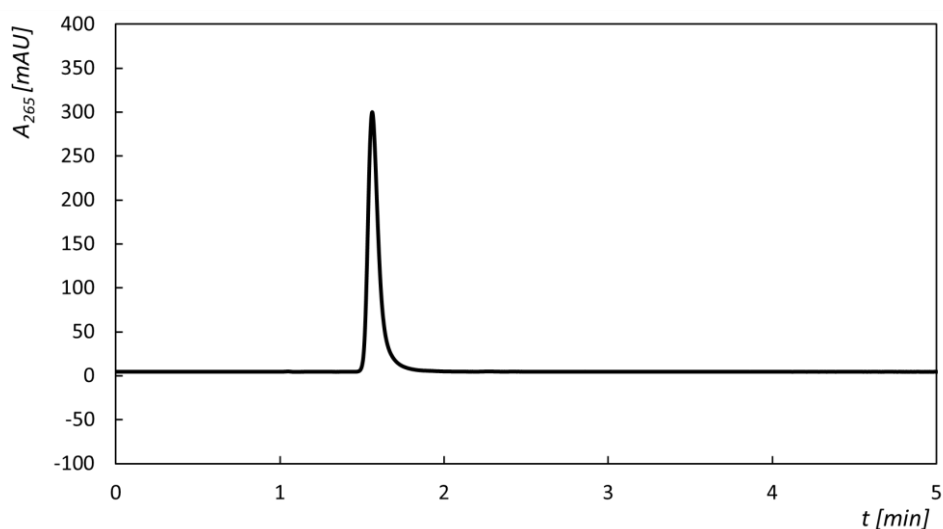
- ACQUITY UPLC CSH Fluoro-phenyl (100 × 2,1 mm; 1,7 μm; 130 Å)
Waters Corporation, USA
- Kinetex® 1,7 μm 5FS (100 × 2,1 mm; 1,7 μm; 100 Å) Phenomenex, USA
- ACQUITY UPLC BEH HILIC (100 × 2,1 mm; 1,7 μm; 130 Å) Waters Corporation, USA
- ACQUITY UPLC BEH HILIC amide (100 × 2,1 mm; 1,7 μm; 130 Å)
Waters Corporation, USA

4 Výsledky a diskuse

4.1 Základní měření na vybraných kolonách

4.1.1 C18 kolona

Na začátku optimalizačního procesu stála otázka volby vhodné kolony pro 5FU. Všechny pět dříve zmíněných publikovaných metod ke stanovení 5FU využívalo C18 kolony. Proto také padla logicky první volba na C18 kolonu Agilent Poroshell 120 SB-AQ ($100 \times 2,1$ mm; $2,7 \mu\text{m}$; 120 \AA). Oproti kolonám, které využívali autoři publikací, byla tato kolona výrazně kratší a obsahovala také částice poloviční velikosti. Dalo se tedy očekávat, že dojde k výraznému zkrácení retenčního času 5FU, což se také nakonec potvrdilo. Retenční čas 5FU na této koloně byl 1,56 minuty (Obr. 7).



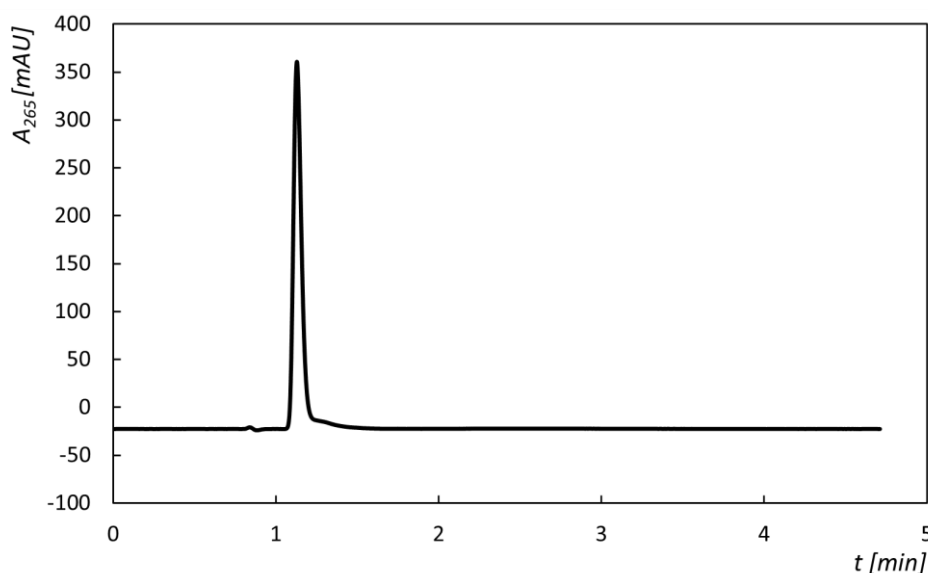
Obr. 7: Separace 1 mM 5FU na C18 koloně. Retenční čas 5FU: 1,56 min. Podmínky: průtok $0,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; objem nástřiku $1 \mu\text{l}$. Složení MF: 98/2 10 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH = 4,5/MeOH. Kolona: Agilent Poroshell 120 SB-AQ ($100 \times 2,1$ mm; $2,7 \mu\text{m}$; 120 \AA); teplota kolony $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Takto krátký retenční čas sice na jednu stranu výrazně zkracuje dobu analýzy, což je z praktického hlediska výhodné, na stranu druhou je ale při takto krátkém retenčním čase velmi pravděpodobné, že se analyt bude nacházet až v přílišné blízkosti mrtvého času. Aby se tento předpoklad buď potvrdil anebo vyvrátil, byl změřen mrtvý čas této kolony, který byl stanoven na 1 minutu.

Následně byl vypočítán retenční faktor C18 kolony, který byl 0,56. Jednalo se o relativně nízkou hodnotu, která potvrdila nízkou afinitu 5FU ke stacionární fázi.

4.1.2 C18 kolona s pozitivně upraveným povrchem

Jako další byla vybrána C18 kolona s pozitivně upraveným povrchem Kinetex® 2,6 μm PS C18 (100 \times 2,1 mm; 2,6 μm ; 100 Å). Pozitivní úprava povrchu této kolony má podle výrobce omezit sekundární interakce mezi separovanými látkami a silikagelem na povrchu nosiče stacionární fáze. Měla by se navíc omezit míra chvostování chromatografických píků.²³

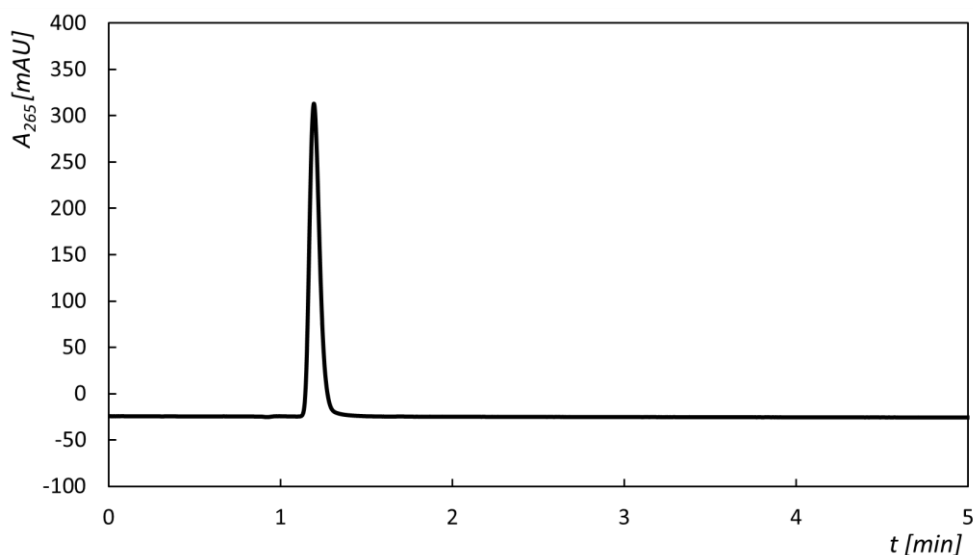


Obr. 8: Separace 1 mM 5FU na C18 PS koloně. Retenční čas 5FU: 1,13 min. Podmínky: průtok 0,3 ml·min⁻¹; objem nástřiku 1 μl . Složení MF: 98/2 10 mM CH₃COONH₄, pH = 4,5/MeOH. Kolona: Kinetex® 2,6 μm PS C18 (100 \times 2,1 mm; 2,6 μm ; 100 Å); teplota kolony 25 °C.

Retenční čas 5FU na C18 koloně s pozitivní úpravou povrchu (C18 PS) byl 1,13 minut (Obr. 8) a její mrtvý čas 0,9 min. Retenční faktor 5FU byl 0,26. Na této koloně tedy 5FU eluoval ještě mnohem blíže mrtvému času než u předchozí standardní C18 kolony.

4.1.3 Fenyl-hexylová kolona

Třetí testovanou kolonou byla Poroshell 120 Phenyl-hexyl ($100 \times 2,1$ mm; $2,7 \mu\text{m}$; 120 \AA). Jednalo se o fenyl-hexylovou kolonu, která by měla umožňovat zvýšenou retenci látek s aromatickým jádrem díky umožnění π - π interakcí.²⁴



Obr. 9: Separace 1 mM 5FU na fenyl-hexyl koloně. Retenční čas 5FU: 1,19 min. Podmínky: průtok $0,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; objem nástřiku $1 \mu\text{l}$. Složení MF: 98/2 10 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH = 4,5/MeOH. Kolona: Poroshell 120 Phenyl-hexyl ($100 \times 2,1$ mm; $2,7 \mu\text{m}$; 120 \AA); teplota kolony $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Retenční čas 5FU na této koloně byl 1,19 minuty (Obr. 9), mrtvý čas 0,9 minuty a retenční faktor 0,32. 5FU tedy opět eluoval v těsné blízkosti mrtvého času kolony.

4.1.4 CSH fluoro-fenyl kolona

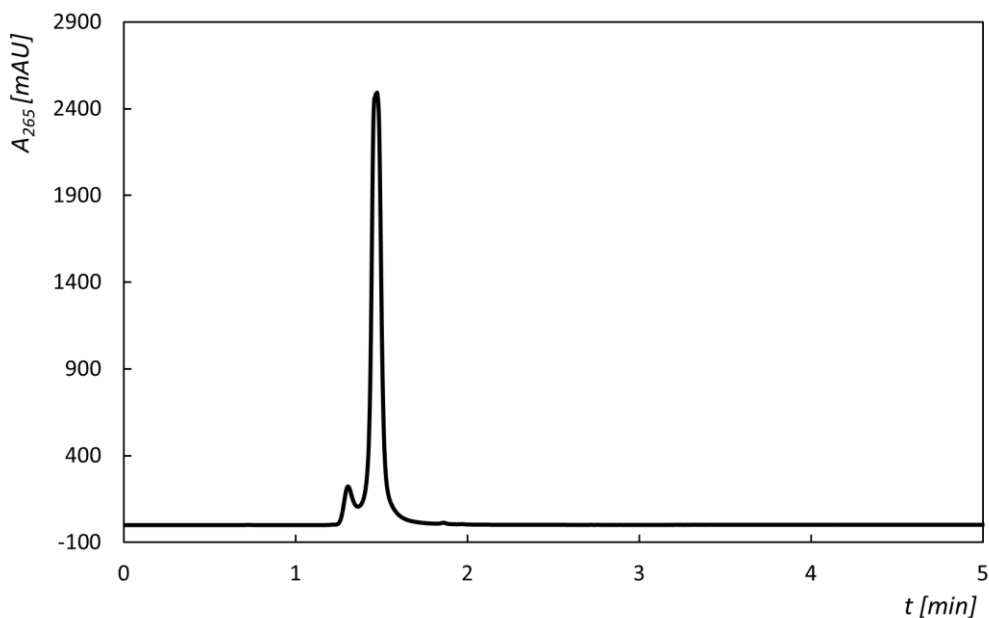
Následující testované kolony (fluorové, HILIC) byly navrženy pro systém UHPLC, proto byl při jejich testování použit Waters ACQUITY UPLC H-Class namísto doposud používaného Agilent 1260 Infinity.

Analyty substituované fluorem jsou podle některé literatury zadržovány na fluorových kolonách lépe než na kolonách alkylových a fenylových. Tento jev je vysvětlován velkým dipólovým momentem a malou polaritou fluorové funkční skupiny na SF kolony.²⁵ Z tohoto důvodu bylo po vyzkoušení několika

předchozích alkylových a jedné fenylové kolony přikročeno i k testování několika fluorových kolon.

První kolonou obsahující fluor ve své SF byla ACQUITY UPLC CSH Fluoro-phenyl (100 × 2,1 mm; 1,7 μm; 130 Å). SF této kolony je tvořena hybridními částicemi s nabitým povrchem (CSH; *angl. Charged Surface Hybrid*), které by měly umožňovat lepší retenci kyselých analytů. CSH technologie vychází z technologie hybridních částic s etylenovým můstkem (BEH; *angl. Bridged Ethylene Hybrid*).²⁶

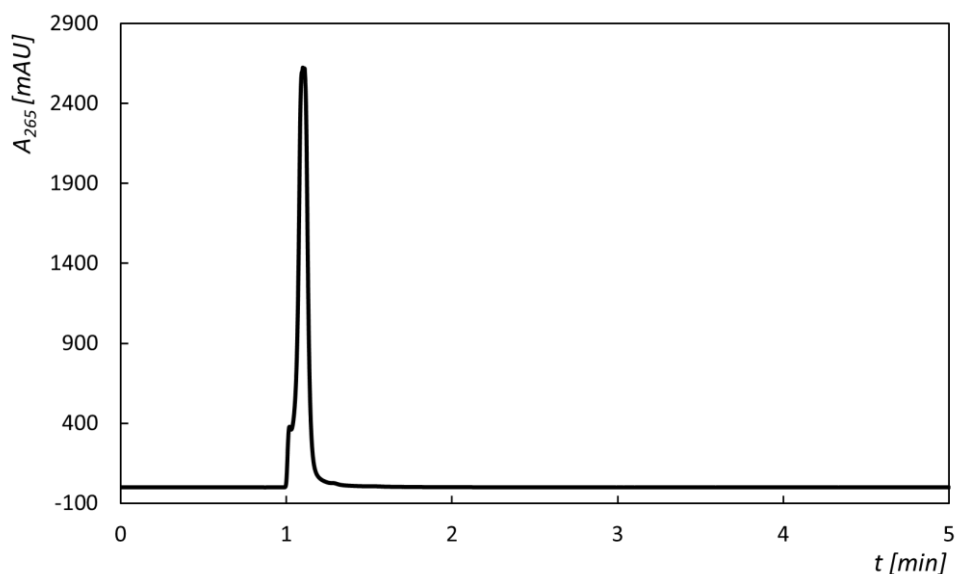
Retenční čas 5FU na této koloně byl v průměru 1,40 minut, mrtvý čas 0,74 minut a vypočítaný retenční faktor 0,89. Jak je vidět na níže uvedeném chromatogramu (*Obr. 10*), došlo k deformaci píku 5FU, při které se začal před hlavním píkem objevovat další drobný pík. Tato deformace mohla vzniknout v důsledku předávkování kolony vinou většího nástřiku vzorku. Větší objem nástřiku vzorku byl u UHPLC kolon zaveden z důvodů dříve vzniklých technických obtíží.



Obr. 10: Separace 1 mM 5FU na CSH fluoro-fenyl koloně. Retenční čas 5FU: 1,48 min. Podmínky: průtok 0,3 ml·min⁻¹; objem nástřiku 10 μl. Složení MF: 93/7 10 mM CH₃COONH₄, pH = 4,5/MeOH. Kolona: ACQUITY UPLC CSH Fluoro-phenyl (100 × 2,1 mm; 1,7 μm; 130 Å); teplota kolony 25 °C.

4.1.5 Pentafluoro-fenyl kolona

Další kolonou s fluorem byla pentafluoro-fenylková kolona Kinetex® 1,7 μm 5FS (100 \times 2,1 mm; 1,7 μm ; 100 Å). Retenční čas 5FU byl 1,11 minut, mrtvý čas 0,80 minut a retenční faktor 0,39. Jak ukazuje uvedený chromatogram (Obr. 11), i u této fluorové kolony došlo k jemné deformaci píku 5FU. Oproti předchozí fluoro-fenylkové koloně se ale jednalo o méně výraznou deformaci.

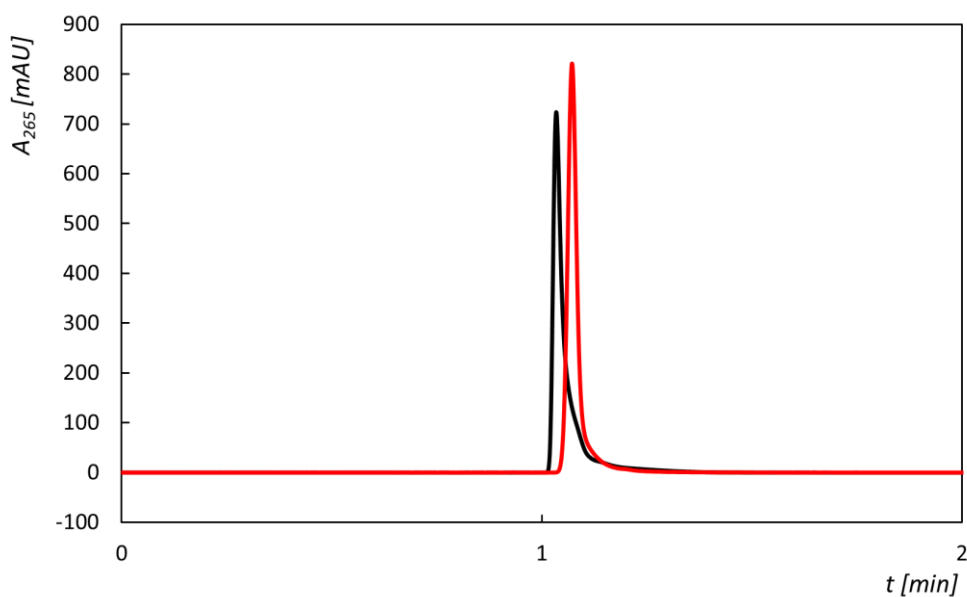


Obr. 11: Separace 1 mM 5FU na CSH pentafluoro-fenyl koloně. Retenční čas 5FU: 1,11 min. Podmínky: průtok 0,3 ml·min⁻¹; objem nástřiku 10 μl . Složení MF: 98/2 10 mM CH₃COONH₄, pH = 4,5/MeOH. Kolona: Kinetex® 1,7 μm 5FS (100 \times 2,1 mm; 1,7 μm ; 100 Å); teplota kolony 25 °C.

4.1.6 BEH HILIC kolona

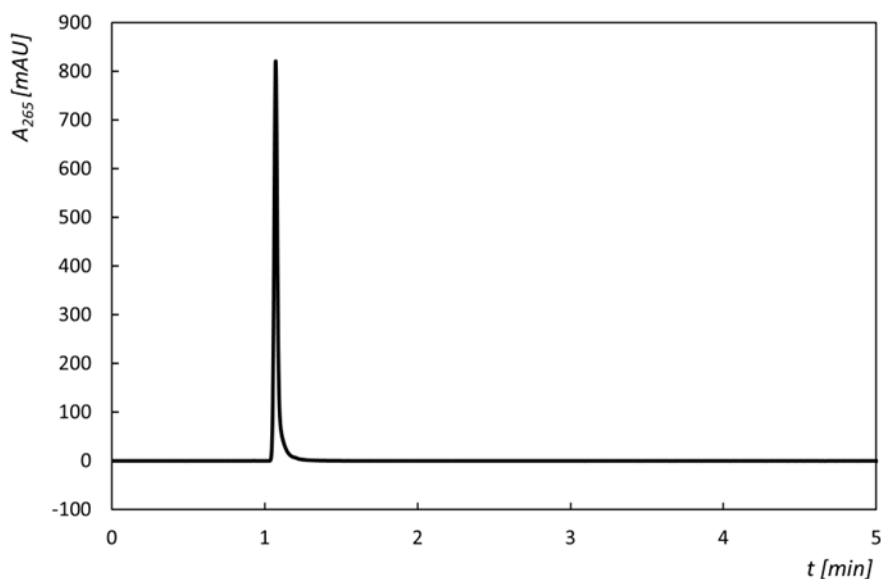
Po vyzkoušení alkylových, fluorových a jedné fenyl-hexylové kolony bylo přikročeno k testování HILIC kolon. Ty byly vybrány, protože vynikají při analýze velmi polárních molekul a 5FU je právě polární molekulou. Za zkratkou BEH v názvu obou HILIC kolon stojí pojem technologie hybridních částic s etylenovým můstkem (*angl. Bridged Ethylene Hybrid*).

U kolon typu HILIC bylo zaznamenáno zvýšení signálu píku 5FU při ředění jeho standardu pomocí ACN namísto doposud používané deionizované vody (*Obr. 12*). Výška píku při ředění standardu deionizovanou vodou byla 722 mAU a při ředění ACN se zvýšila na 821 mAU. Došlo také k drobnému prodloužení retenčního času z 1,03 minut na 1,07 minut.



Obr. 12: Srovnání separace 1 mM 5FU při jeho ředění deionizovanou vodou (černá) a acetonitrilem (červená). Podmínky: průtok $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; objem nástřiku $1 \mu\text{l}$. Složení MF: 5/95 voda/ACN. Kolona: ACQUITY UPLC BEH HILIC ($100 \times 2,1 \text{ mm}$; $1,7 \mu\text{m}$; 130 \AA); teplota kolony $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

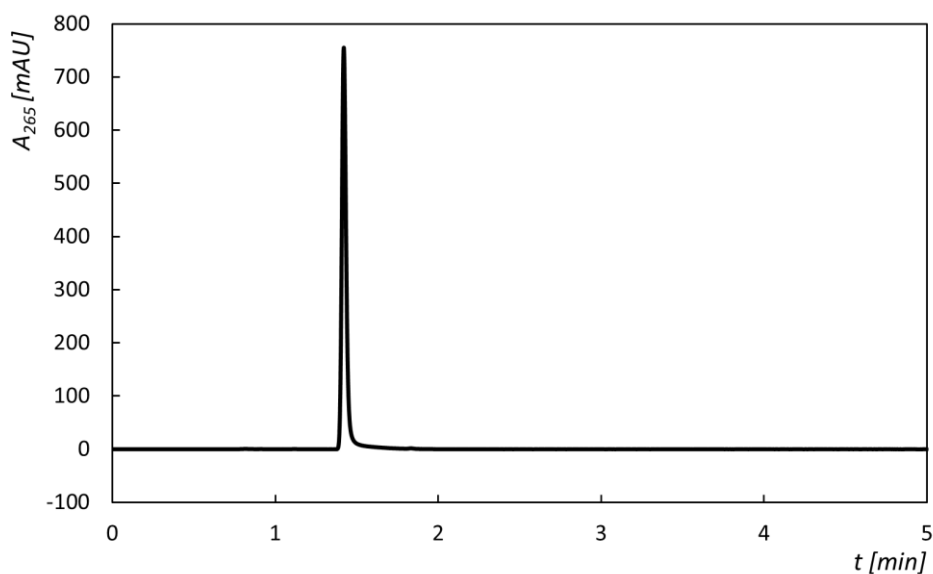
První testovanou HILIC kolonou byla kolona ACQUITY UPLC BEH HILIC ($100 \times 2,1 \text{ mm}$; $1,7 \mu\text{m}$; 130 \AA). Na ní byl retenční čas 5FU 1,07 minut (*Obr. 13*), mrtvý čas 0,75 minut a retenční faktor 0,43.



Obr. 13: Separace 1 mM 5FU na BEH HILIC koloně. Retenční čas 5FU: 1,07 min. Podmínky: průtok $0,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; objem nástřiku $1 \mu\text{l}$. Složení MF: 5/95 voda/ACN. Kolona: ACQUITY UPLC BEH HILIC ($100 \times 2,1 \text{ mm}$; $1,7 \mu\text{m}$; 130 \AA); teplota kolony $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.1.7 BEH HILIC amidová kolona

Druhou HILIC kolonou byla kolona ACQUITY UPLC BEH HILIC amide ($100 \times 2,1 \text{ mm}$; $1,7 \mu\text{m}$; 130 \AA). Ta měla oproti předchozí HILIC koloně na své SF terciárně vázané amidové skupiny a byla navíc použitelná v širším rozmezí pH.²⁷



Obr. 14: Separace 1 mM 5FU na BEH HILIC amidové koloně. Retenční čas 5FU: 1,42 min. Podmínky: průtok $0,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; objem nástřiku $1 \mu\text{l}$. Složení MF: 5/95 voda/ACN. Kolona: ACQUITY UPLC BEH HILIC amide ($100 \times 2,1 \text{ mm}$; $1,7 \mu\text{m}$; 130 \AA); teplota kolony $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

5FU měl na této koloně retenční čas v průměru 1,55 minut. Mrtvý čas byl 0,76 minut a retenční faktor 1,04. Ilustrační měření je zobrazeno na výše uvedeném chromatogramu (*Obr. 14*). Tato HILIC kolona tedy zadržovala 5FU lépe než předchozí HILIC kolona.

4.1.8 Základní srovnání retence 5FU na použitých kolonách

V níže uvedené tabulce (*Tab. 2*) je přehled získaných retenčních časů a vypočítaných retenčních faktorů otestovaných kolon.

Tab. 2: Přehled získaných retenčních parametrů testovaných kolon.

System	Typ kolony	Retenční čas 5FU [min]	Mrtvý čas [min]	Retenční faktor
HPLC	C18	1,56	1,00	0,56
	C18 PS	1,13	0,90	0,26
	Fenyl-hexyl	1,19	0,90	0,32
UHPLC	CSH Fluoro-fenyl	1,40	0,74	0,89
	Pentafluoro-fenyl	1,11	0,80	0,39
	HILIC BEH	1,07	0,75	0,43
	HILIC BEH amide	1,55	0,76	1,04

Nejvyšší retenční čas byl naměřen na C18 koloně (1,56 minut) a na HILIC BEH amidové koloně (1,55 minut). Čistě na základě retenčních časů by se mohlo zdát, že C18 kolona je tou vhodnější. Tato kolona má ale poměrně vysoký mrtvý čas, což vede ke snížení jejího retenčního faktoru.

Při započítání mrtvých časů vychází naopak nejlépe HILIC BEH amidová kolona s retenčním faktorem 1,04 v závěsu s CSH Fluoro-fenylovou kolonou s retenčním faktorem 0,89. Ani tento retenční faktor však neznamena úspěšnou separaci analytu od možných nečistot eluujících v blízkosti mrtvého času. Proto byly učiněny další pokusy o zvýšení retence na kolonách C18 a HILIC BEH amide, které poskytly nejlepší výsledky.

4.2 Zvýšení retence změnou chromatografických podmínek

4.2.1 Kyselina mravenčí v MF na C18 PS a HILIC BEH amidové koloně

Ve snaze zlepšit retenci 5FU byla vyzkoušena na dvou kolonách MF obsahující 0,1 % roztok kyseliny mravenčí. Ta byla zvolena proto, aby se otestovala retence 5FU při kyseljším pH. MF obsahující kyselinu mravenčí byla vyzkoušena na Kinetex® 2,6 µm PS C18 (100 × 2,1 mm; 2,6 µm; 100 Å) a ACQUITY UPLC BEH HILIC amide (100 × 2,1 mm; 1,7 µm; 130 Å).

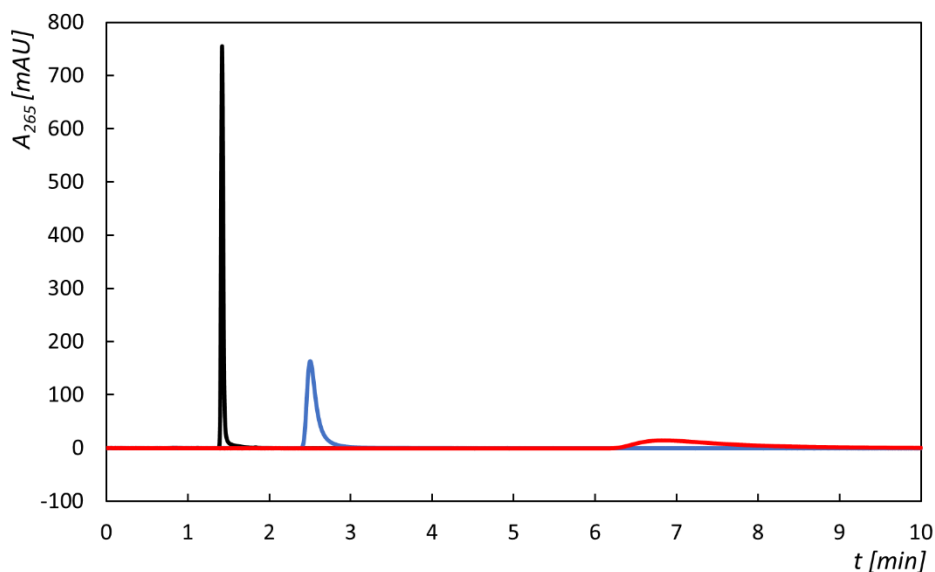
Na C18 PS koloně temperované na 25 °C byla provedena separace 1 mM 5FU při průtoku 0,3 ml·min⁻¹, objemu nástřiku 1 µl a složení MF 0,1 % HCOOH a MeOH v poměru 2/98. Vlivem změny ve složení MF došlo k prodloužení retenčního času z původních 1,13 minut na 1,36 minut. Retence 5FU se tedy zvýšila, stále se ale jednalo o poměrně neuspokojivé výsledky.

Použití kyseliny mravenčí v MF bylo také vyzkoušeno na BEH HILIC amidové koloně temperované na 25 °C při průtoku 0,3 ml·min⁻¹, objemu nástřiku vzorku 1 µl a složení MF 0,1 % HCOOH a ACN v poměru 5/95. Nový retenční čas 5FU byl po zprůměrování hodnot dvou provedených měření 1,80 minut. Oproti původním 1,55 minutám se tedy retenční čas prodloužil o 0,25 minut. Záměna vody za 0,1 % roztok kyseliny mravenčí tedy v tomto případě také lehce přispěla k prodloužení retence zkoumaného analytu. Opět se ale jednalo o poměrně nevýrazné zlepšení.

4.2.2 Změna poměru složení MF na HILIC BEH amidové koloně

Jak je vidět v tabulce zobrazující přehled retenčních časů již vyzkoušených kolon (*Tab. 2*), HILIC BEH amidová kolona dosáhla nejlepšího výsledku, co se retenčního faktoru týče. Proto byla vybrána jako zástupkyně HILIC kolon pro další testování.

Ve snaze zlepšit retenci 5FU na této koloně byly vyzkoušeny další dva poměry složení MF: 3/97 a 2/98 voda/ACN (*Obr. 15*).



Obr. 15: Srovnání separace 1 mM 5FU na BEH HILIC amidové koloně při složení MF 5/95 voda/ACN (černá), 3/97 voda/ACN (modrá) a 2/98 voda/ACN (červená). Podmínky: průtok 0,3 ml·min⁻¹; objem nástřiku 1 μl. Kolona: ACQUITY UPLC BEH HILIC amide (100 × 2,1 mm; 1,7 μm; 130 Å); teplota kolony 25 °C.

Při snížení podílu vody v MF došlo sice k prodloužení retenčního času, ale zároveň došlo k drastickému rozmytí píku. Pík připadající 5FU v MF skládající se z vody a ACN v poměru 3/97 byl téměř čtyřikrát menší než pík 5FU ve vodě a ACN v poměru 5/95. Signál 5FU při použití MF složené z vody a ACN v poměru 2/98 byl stěží zaznamatelný (Tab. 3).

Tab. 3: Srovnání zprůměrovaných opakovaných měření různých poměrů vody a ACN v MF na BEH HILIC amidové koloně.

Složení MF	Čas [min]	Směrodatná odchylka [min]	Plocha [mAU·s]	Směrodatná odchylka [mAU·s]	Výška [mAU]	Směrodatná odchylka [mAU]
5 % voda + 95 % ACN	1,55	0,13	1 365	23	649	98
3 % voda + 97 % ACN	2,35	0,12	1 354	15	199	30
2 % voda + 98 % ACN	6,51	0,44	1 001	19	15	1

4.3 Použití iontově párového činidla

Waters ACQUITY UPLC H-Class, na kterém byly testovány UHPLC kolony byl kromě UV detektoru vybaven také hmotnostním detektorem, u kterého hrozilo nebezpečí jeho potencionálního zanesení iontově párovým činidlem.

Z bezpečnostních důvodů bylo tedy iontově párové činidlo testováno jen na kolonách vhodných pro Agilent 1260 Infinity.

Obě doposud testované fluorové kolony byly bohužel stavěné na UHPLC systém, a tudíž byly testovány právě na Waters ACQUITY UPLC H-Class. Aby mohlo být iontově párové činidlo vyzkoušeno i na typu kolon s fluorem, musel být vybrán jejich nový zástupce, který by byl použitelný na Agilent 1260 Infinity. Místo dvou dříve použitých fluorových kolon byla vybrána kolona Discovery® HS F5 (150 × 4,6 mm; 5,0 μm; 120 Å).

4.3.1 Optimální koncentrace iontově párového činidla

Jako iontově párové činidlo byl zvolen hydrát chloridu tetrabutylamonného (TBAC hydrát; *angl. tetrabutylammonium chloride hydrate*). Celkem byly vyzkoušeny tři koncentrace jeho roztoku: 2 mmol·l⁻¹, 5 mmol·l⁻¹ a 10 mmol·l⁻¹. Měření pro všechny zmíněné koncentrace bylo realizováno na koloně Agilent Poroshell 120 SB-AQ (100 × 2,1 mm; 2,7 μm; 120 Å) temperované na 25 °C, při průtoku 0,3 ml·min⁻¹ a objemu nástríku vzorku 1 μl. Mobilní fáze se skládala z 10 mM CH₃COONH₄, pH = 8,0 s TBAC hydrátem příslušné koncentrace a MeOH v poměru 98/2. Jako vzorek byl použit 1 mM standard 5FU.

Nejlepšího výsledku, co se prodloužení retenčního času 5FU týče, dosahoval 5 mM roztok (2,79 min) těsně následovaný 10 mM roztokem (2,74 min). Koncentrace 2 mmol·l⁻¹ měla o něco kratší retenční čas (2,29 min) než zbylé dvě koncentrace, a právě proto byla pro další měření zamítnuta.

Výše uvedené výsledky jsou směrodatné pouze v případě, že koncentrace analytu ve vzorku nepřesáhne koncentraci použitého iontově párového činidla. Čím vyšší bude totiž předpokládaná koncentrace analytu, tím vyšší musí být i koncentrace použitého iontově párového činidla. Na základě provedených měření byla pro předpokládanou koncentraci 5FU nepřesahující hladinu 1 mmol·l⁻¹ zvolena 5 mM koncentrace TBAC hydrátu.

4.3.2 pH mobilní fáze při použití iontově párového činidla

Souběžným krokem s určením optimální koncentrace hydrátu TBAC byla volba adekvátního pH MF, protože na něm je také závislá účinnost iontově párového činidla, které se váže na analyt, jen pokud je analyt ve formě iontu. Z toho vyplývá, že čím větší množství analytu bude v ionizované podobě, tím více se ho bude vázat i na iontově párové činidlo. Správné nastavení pH má tedy v tomto případě směřovat k co největší ionizaci analytu.

5FU má pK_a 8,02 a tudíž by pH MF mělo být směřováno do zásadité oblasti. Horní hranici testovaného rozsahu pH MF určoval hlavně pracovní interval pH samotných kolon, jehož horní hranice končila v průměru na pH 8,0. Celkem byly s iontově párovým činidlem vyzkoušeny dvě hladiny pH: 7,0 která měla výhodu v podobě dostatečné rezervy do maximálního pracovního pH dané kolony a 8,0, která představovala hladinu hraniční.

Měření byla provedena na koloně Agilent Poroshell 120 SB-AQ (100 × 2,1 mm; 2,7 μm ; 120 Å) temperované na 25 °C, při průtoku 0,3 ml·min⁻¹ a objemu nástriku vzorku 1 μl . Mobilní fáze byla složena z 10 mM CH₃COONH₄ o příslušném pH s 5 mM TBAC hydrátem a MeOH v poměru 98/2. Jako vzorek byl použit 1 mM standard 5FU.

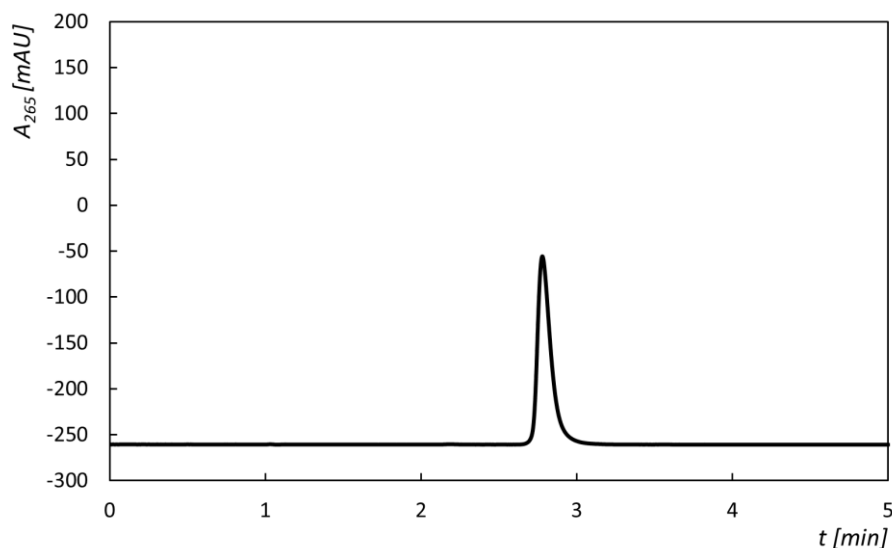
Při pH 7,0 byl retenční čas 5FU v průměru 1,90 minut a při použití pH 8,0 v průměru 2,79 minut. MF o vyšším pH vykazovala tedy téměř o jednu celou minutu delší retenční čas. To odpovídalo dříve zmíněné teorii o míře účinnosti iontově párového činidla při vyšší disociaci analytu. Pro podmínky optimalizované metody na stanovení 5FU bylo tedy zvoleno pH MF 8,0.

4.4 Prodloužení retenčního času 5FU na testovaných kolonách po přidání iontově párového činidla do MF

Poté, co byla zvolena koncentrace iontově párového činidla a hodnota pH MF, mohlo dojít k vyzkoušení nově nabitých poznatků na všech čtyřech kolonách.

4.4.1 Retenční čas 5FU na C18 koloně při použití iontově párového činidla

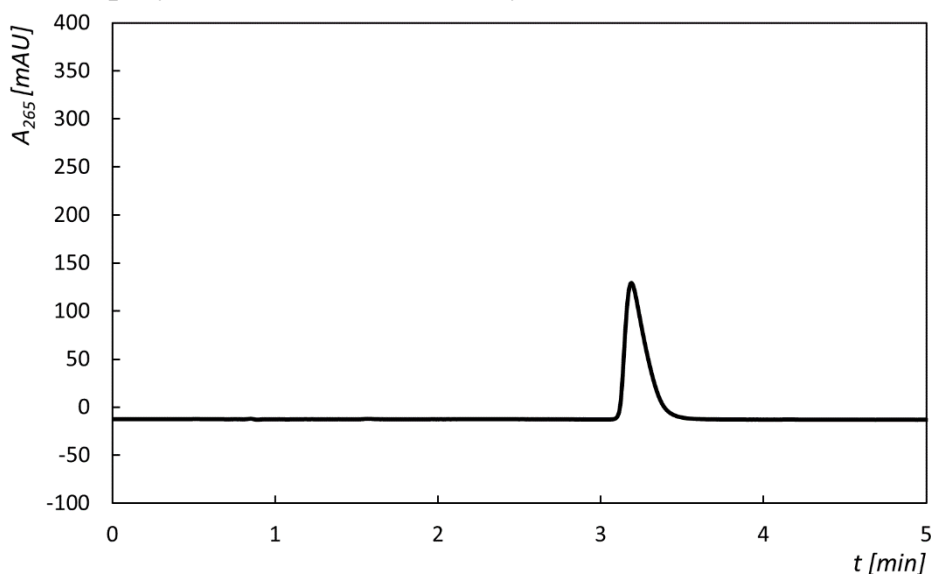
Jak bylo již částečně zmíněno v předchozí kapitole, na C18 koloně došlo k posunu retenčního času 5FU z původních 1,56 minut na 2,79 minut. Původní retenční faktor stoupl z 0,56 na 1,79. Ilustrační měření je zobrazeno na níže uvedeném chromatogramu (*Obr. 16*).



Obr. 16: Separace 1 mM 5FU na C18 koloně. Retenční čas 5FU: 2,78 min. Podmínky: průtok $0,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; objem nástřiku $1 \mu\text{l}$. Složení MF: 98/2 10 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH = 8,0 s 5 mM TBAC hydrátem/MeOH. Kolona: Agilent Poroshell 120 SB-AQ ($100 \times 2,1 \text{ mm}$; $2,7 \mu\text{m}$; 120 \AA); teplota kolony $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.4.2 Retenční čas 5FU na C18 PS koloně při použití iontově párového činidla

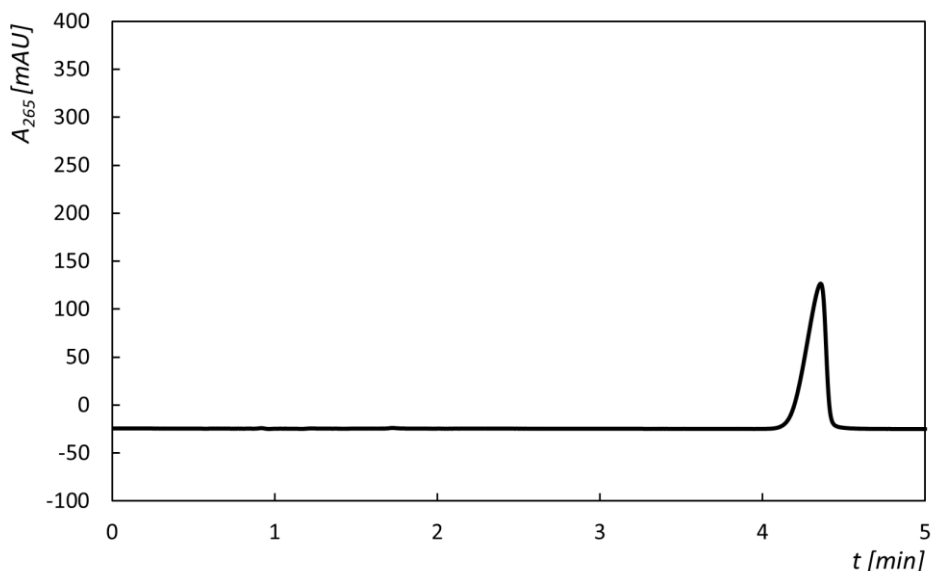
Na C18 PS koloně se retenční čas v průměru posunul z 1,13 minut na 3,18 minut a retenční faktor z 0,26 na 2,53. Jedno z měření je zobrazeno na přiloženém chromatogramu (*Obr. 17*). Oproti píkům na C18 koloně se jednalo o méně souměrné píky, které více chvostovaly.



Obr. 17: Separace 1 mM 5FU na C18 PS koloně. Retenční čas 5FU: 3,19 min. Podmínky: průtok $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; objem nástřiku $1 \mu\text{l}$. Složení MF: 98/2 10 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ pH 8,0 s 5mM TBAC hydrátem/MeOH. Kolona: Kinetex® 2,6 μm PS C18 ($100 \times 2,1 \text{ mm}$; 2,6 μm ; 100 Å); teplota kolony 25 °C.

4.4.3 Retenční čas 5FU na fenyl-hexylové koloně při použití iontově párového činidla

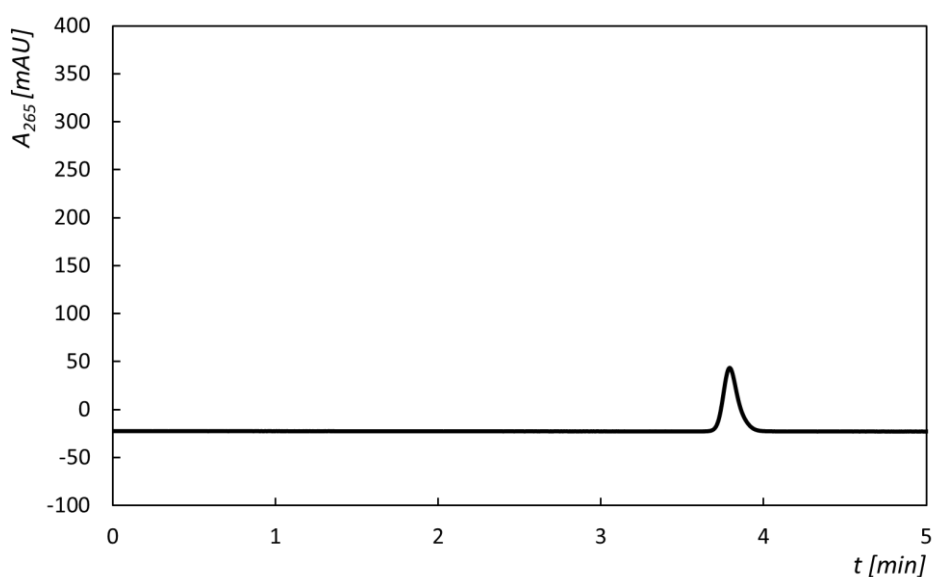
U fenyl-hexylové kolony v průměru došlo po přidání iontově párového činidla dokonce k prodloužení retenčního času z původních 1,19 minut na 4,36 minut a nárůstu retenčního faktoru z 0,32 na 3,84. Toto výraznější zvýšení retence oproti C18 koloně může být způsobeno zapojením π - π interakcí do retenčního mechanismu. Ilustrativní měření je zobrazeno na chromatogramu (Obr. 18) uvedeném níže. Píky opět nebyly stoprocentně souměrné a byly lehce zepředu rozmyté.



Obr. 18: Separace 1 mM 5FU na fenyl-hexyl koloně. Retenční čas 5FU: 4,36 min. Podmínky: průtok $0,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; objem nástřiku $1 \mu\text{l}$. Složení MF: 98/2 10 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH = 8,0 s 5 mM TBAC hydrátem/MeOH. Kolona: Poroshell 120 Phenyl-hexyl ($100 \times 2,1 \text{ mm}$; $2,7 \mu\text{m}$; 120 \AA); teplota kolony $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.4.4 Retenční čas 5FU na HS F5 koloně při použití iontově párového činidla

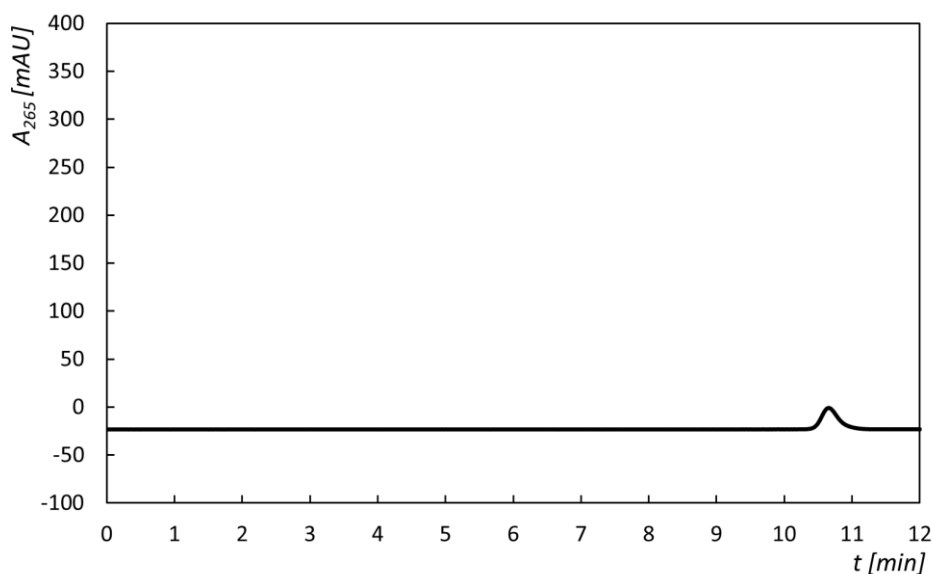
HS F5 kolona, která byla vybrána coby náhrada za fluorové kolony koncipované na UHPLC, poskytovala v průměru pro 5FU retenční čas 3,88 minut bez použití iontově párového činidla. Jelikož se jednalo oproti ostatním kolonám o 5 cm delší kolonu, byl i její mrtvý čas vyšší (2,2 minut). Vypočítaný retenční faktor byl 0,76. Jedno z opakovaných měření je pro lepší představu znázorněno v níže uvedeném chromatogramu (*Obr. 19*). Ve srovnání s předešlou C18 kolonou došlo k několikanásobnému zmenšení signálu 5FU.



Obr. 19: Separace 1 mM 5FU na HS F5 koloně. Retenční čas 5FU: 3,79 min. Podmínky: průtok 3 ml·min⁻¹; objem nástřiku 1 μl. Složení MF: 98/2 10 mM CH₃COONH₄, pH = 8,0/MeOH. Kolona: Discovery® HS F5 (150 × 4,6 mm; 5,0 μm; 120 Å); teplota kolony 25 °C.

Při srovnání retenčního faktoru 5FU na HS F5 koloně s tabulkou zobrazující přehled retenčních faktorů kolon bez použití iontově párového činidla (*Tab. 2*), je vidět, že HS F5 kolona dosahovala třetího nejvyššího retenčního faktoru. Přítomnost fluorových funkčních skupin ve stacionární fázi tedy vedla k podpoře retence 5FU.

Po přidání iontově párového činidla do MF se retenční čas 5FU v průměru zvedl z 3,88 minut na 10,43 minut a retenční faktor z 0,76 na 3,74. Jedno z opakovaných měření je pro ilustraci uvedeno na chromatogramu (*Obr. 20*).



Obr. 20: Separace 1 mM 5FU na HS F5 koloně. Retenční čas 5FU: 10,65 min. Podmínky: průtok 3 ml·min⁻¹; objem nástřiku 1 μl. Složení MF: 98/2 10 mM CH₃COONH₄, pH = 8,0 s 5 mM TBAC hydrátem/MeOH. Kolona: Discovery® HS F5 (150 × 4,6 mm; 5,0 μm; 120 Å); teplota kolony 25 °C.

Při používání iontově párového činidla se drasticky zvýšila doba, kterou kolona potřebovala ke svému ustálení. Bylo nutné čekat minimálně půl hodiny, než se retenční časy 5FU při opakovaných měřeních ustálily. Tento nedostatek byl pravděpodobně zapříčiněn většími rozměry kolony.

V tabulce (Tab. 4) srovnávající retenční parametry 5FU na čtyřech kolonách, které byly vybrány k testování iontově párového činidla, je vidět, že nejvyšší retenční faktor patřil dvěma kolonám fenyl-hexylové a HS F5. U HS F5 kolony však došlo také k výraznému snížení velikosti píku 5FU. Oproti zbylým třem kolonám došlo v průměru k jeho trojnásobnému zmenšení.

Tab. 4: Srovnání retenčních parametrů 1 mM 5FU na čtyřech vybraných kolonách při aplikaci iontově párového činidla.

Typ kolony	Retenční čas 5FU [min]	Plocha [mAU·s]	Mrtvý čas [min]	Retenční faktor
C18	2,79	1 165	1,0	1,79
C18 PS	3,18	1 263	0,9	2,53
Fenyl-hexyl	4,36	1 250	0,9	3,84
HS F5	10,43	400	2,2	3,74

4.5 Opakovatelnost a kalibrační závislost na dvou vybraných kolonách

Pro co nejvíce informované rozhodnutí, která ze dvou kolon bude nakonec vhodnější pro stanovení 5FU, byla u obou kolon změřena kalibrační závislost, opakovatelnost, LOD a LOQ.

4.5.1 Opakovatelnost, kalibrační závislost, LOD a LOQ fenyl-hexylové kolony

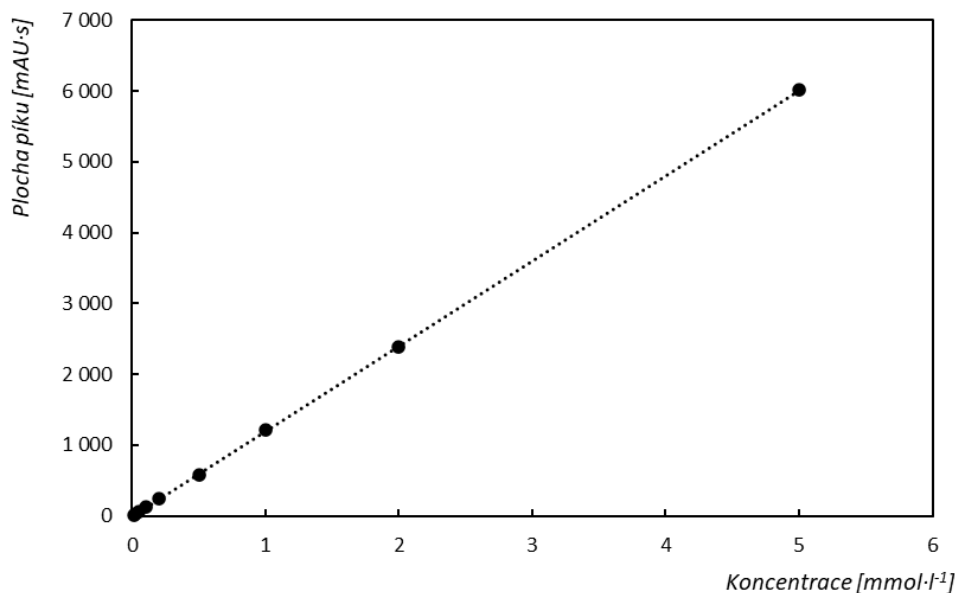
Pro vyjádření míry opakovatelnosti bylo provedeno deset po sobě jdoucích měření pro dvě koncentrace 5FU 0,5 mmol·l⁻¹ a 0,05 mmol·l⁻¹. Mediány chromatografických parametrů se statistickými ukazateli jsou uvedeny v (Tab. 5).

Tab. 5: Opakovatelnost metody pro koncentraci 5FU 0,5 mmol·l⁻¹ a 0,05 mmol·l⁻¹. Podmínky: průtok 0,3 ml·min⁻¹; objem nástřiku 1 µl. Složení MF: 98/2 10 mM CH₃COONH₄, pH = 8,0 s 5 mM TBAC hydrátem/MeOH. Kolona: Poroshell 120 Phenyl-hexyl (100 × 2,1 mm; 2,7 µm; 120 Å); teplota kolony 25 °C.

		Retenční čas [min]	Plocha [mAU·s]	Výška [mAU]
0,5 mM 5FU	medián	4,418	589,7	82,23
	SD	0,002	3,2	0,23
	RSD %	0,05	0,5	0,3
0,05 mM 5FU	medián	4,367	58,6	9,10
	SD	0,002	0,9	0,10
	RSD %	0,05	1,5	1,1

Ze skutečnosti, že RSD retenčního času dosáhla v případě obou koncentrací hodnoty 0,05 %, vyplývá, že retenční časy jsou velmi stabilní. RSD ploch píků vyšla 0,5 % pro vyšší koncentraci a 1,5 % pro koncentraci nižší. Pro výšky píku vyšla RSD 0,3 % u 0,5 mM koncentrace a 1,1 % u 0,05 mM koncentrace. Opakovatelnost jak pro plochy píků, tak pro výšky píků dosahovala dobrých výsledků, přičemž vyšší RSD u nižší koncentrace je běžným jevem, který je způsoben menší relativní přesností měření a integrací menších píků.

Kalibrační závislost byla proměřena v koncentracích 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5 mmol·l⁻¹. Z naměřených hodnot byl sestrojen graf závislosti ploch píků na výše zmíněných koncentracích (Obr. 21).



Obr. 21: Kalibrační závislost ploch píků na koncentracích standardů 5FU na fenyln-hexylové koloně. Podmínky: průtok 0,3 ml·min⁻¹; objem nástřiku 1 μl. Složení MF: 98/2 10 mM CH₃COONH₄, pH = 8,0 s 5 mM TBAC hydrátem/MeOH. Kolona: Poroshell 120 Phenyl-hexyl (100 × 2,1 mm; 2,7 μm; 120 Å); teplota kolony 25 °C.

Sestrojený graf byl nakonec proložen regresní přímkou. Úsek rovnice vzniklé regresní přímky byl roven -2,42 mAU·s, její směrnice byla rovna 1203,80 mAU·s·mmol⁻¹·l a determinační koeficient 1,000. Jak dokazuje graf kalibrační závislosti a předchozí uvedené údaje, naměřená závislost byla dostatečně lineární.

Pro výpočet LOD a LOQ byl sestaven graf závislosti výšek píků na totožných koncentracích 5FU, které byly uvedeny výše. Tento graf byl proložen regresní přímkou. Směrnice této přímky byla v kombinaci s odečtenou hodnotou šumu použita k výpočtu LOD a LOQ jako koncentrace odpovídající signálu rovnému trojnásobku a desetinásobku šumu základní linie.

Směrnice regresní přímky grafu závislosti výšek píků na koncentracích 5FU byla rovna 69,581 mAU·s·mmol⁻¹·l. Odečtený šum základní linie byl

0,1 mAU. Vypočítaná hodnota LOD byla 0,004 mmol·l⁻¹, tedy 4 μmol·l⁻¹ a hodnota LOQ byla rovna 0,014 mmol·l⁻¹, neboli 14 μmol·l⁻¹.

4.5.2 Opakovatelnost, kalibrační závislost, LOD a LOQ na HS F5 koloně

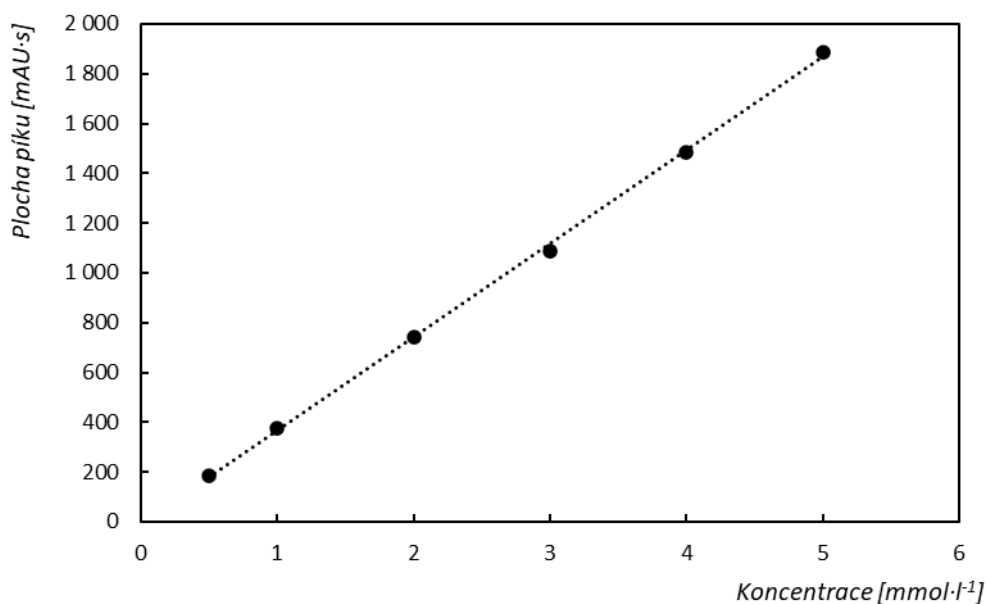
Podobně tak jako u fenyl-hexylové kolony bylo pro vyjádření míry opakovatelnosti provedeno deset po sobě jdoucích měření pro dvě koncentrační hladiny 5FU a to 1 mmol·l⁻¹ a 4 mmol·l⁻¹. Mediány chromatografických parametrů společně se statistickými ukazateli jsou uvedeny v (Tab. 6).

Tab. 6: Opakovatelnost metody pro koncentraci 5FU 4 mmol·l⁻¹ a 1 mmol·l⁻¹. Podmínky: průtok 3 ml·min⁻¹; objem nástřiku 1 μl. Složení MF: 98/2 10 mM CH₃COONH₄, pH = 8,0 s 5 mM TBAC hydrátem/MeOH. Kolona Discovery® HS F5 (150 × 4,6 mm; 5,0 μm; 120 Å); teplota kolony 25 °C.

		Retenční čas [min]	Plocha [mAU·s]	Výška [mAU]
4 mM 5FU	median	10,79	1497,7	74,8
	SD	0,05	3,8	0,6
	RSD %	0,47	0,3	0,7
1 mM 5FU	median	10,55	376,3	21,0
	SD	0,08	1,4	0,2
	RSD %	0,78	0,4	0,9

RSD retenčního času dosáhla u vyšší koncentrace 0,47 % a u koncentrace nižší 0,78 %. Retenční časy 5FU na této koloně po jejím ustálení tedy vykazují uspokojivou opakovatelnost. RSD ploch píků vyšla 0,3 % pro 4 mM koncentraci a 0,4 % pro 1 mM koncentraci. RSD výšek píků byla u vyšší koncentrace 0,7 % u nižší koncentrace 0,9 %.

Kalibrační závislost byla proměřena v koncentracích 0,5; 1; 2; 3, 4, 5 mmol·l⁻¹. Z obdržných údajů byl sestrojen graf závislosti ploch píků na výše zmíněných koncentracích (Obr. 22).



Obr. 22: Kalibrační závislost ploch píků na koncentracích standardů 5FU na HS F5 koloně. Podmínky: průtok $3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; objem nástřiku $1 \mu\text{l}$. Složení MF: 98/2 10 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH = 8,0 s 5 mM TBAC hydrátem/MeOH. Kolona Discovery® HS F5 ($150 \times 4,6 \text{ mm}$; $5,0 \mu\text{m}$; 120 \AA); teplota kolony $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Sestrojený graf byl nakonec proložen regresní přímkou. Úsek rovnice vzniklé regresní přímky měl hodnotu $9,41 \text{ mAU} \cdot \text{s}$, její směrnice $375,12 \text{ mAU} \cdot \text{s} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{l}$ a determinační koeficient 0,999. S přihlédnutím ke grafu kalibrační závislosti a předchozím uvedeným údajům lze závislost považovat za lineární.

Pro výpočet LOD a LOQ byl sestaven graf závislosti výšek píků na totožných koncentracích 5FU, které byly použity dříve. Tento graf byl poté proložen regresní přímkou, přičemž směrnice této přímky byla v kombinaci s odečtenou hodnotou šumu použita k výpočtu LOD a LOQ jako koncentrace odpovídající signálu rovnému troj a desetinásobku šumu základní linie.

Směrnice vzniklé regresní přímky grafu závislosti výšek píků na koncentracích 5FU měla hodnotu $17,636 \text{ mAU} \cdot \text{s} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{l}$. Šum základní linie byl roven $0,1 \text{ mAU}$. Vypočítaná hodnota LOD byla $0,017 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, tedy $17 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a hodnota LOQ byla rovna $0,057 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, neboli $57 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

4.5.3 Konečný výběr kolony pro stanovení 5FU v přítomnosti liposomů

Co se týče opakovatelnosti, obě kolony dosáhly uspokojujících výsledků. Retenční časy u obou kolon byly velmi stabilní, a to až do té míry, že jejich relativní směrodatné odchylky nepřekročily jedno procento. Relativní směrodatná odchylka u ploch píků nepřesáhla u žádné sady měření dvě procenta. Nejvyšší relativní směrodatná odchylka se vyskytla na fenyl-hexylové koloně při měření 0,05 mM koncentrace, kde dosahovala hodnoty 1,5 %. Polehčující okolností budiž, že se stále jedná o poměrně nízkou koncentraci.

LOD 5FU na fenyl-hexylové kolony byla stanovena na $4 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a LOQ na $14 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Na HS F5 koloně byla LOD 5FU stanovena na $17 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a LOQ na $57 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Fenyl-hexylová kolona měla tak čtyřikrát nižší LOD a LOQ.

Jako optimální kolona pro stanovení 5FU v přítomnosti liposomů byla nakonec vybrána kolona fenyl-hexylová. Hlavními důvody byla za prvé dlouhá doba nutná k ustálení HS F5 kolony a za druhé čtyřnásobně nižší LOD a LOQ 5FU na fenyl-hexylové koloně.

4.6 Liposomy

Po dokončení optimalizace podmínek stanovení 5FU, se mohlo začít se stanovením účinnosti enkapsulace jednotlivých liposomů. To ve zkratce spočívalo ve stanovení množství volného neenkapsulovaného 5FU a jeho dosazení do dříve zmíněného vzorce (*Vzorec 2*), který slouží k výpočtu účinnosti enkapsulace.

Účinnost enkapsulace byla stanovena ve čtyřech typech liposomů (*Tab. 7*), které se lišily v druhu použitých lipidů, jejich poměrech, pufru použitým při jejich přípravě a způsobu přidání 5FU.

Tab. 7: Přehled čtyř testovaných liposomů s enkapsulovaným 5FU.

Kód	Lipidy	Poměr lipidů	Koncentrace lipidů	Pufr	Koncentrace 5FU	Přidání 5FU
GN100	DPPC	80	5 mg·ml ⁻¹	10 mM Na-fosfátový pufr	7 mg·ml ⁻¹	nepřímé
	DPPG	18				
	DMPE-2000 PEG 100 nm	2				
GN400	DPPC	80	5 mg·ml ⁻¹	10 mM Na-fosfátový pufr	7 mg·ml ⁻¹	nepřímé
	DPPG	18				
	DMPE-2000 PEG 400 nm	2				
17.1	DSPC	75	5 mg·ml ⁻¹	1 mM Ca-glukonát + 10 % sacharosa	7 mg·ml ⁻¹	přímé
	DSPG	22				
	DMPE-2000 PEG 400 nm	3				
	NBD-PC	0,5				
120	DSPC	75	5 mg·ml ⁻¹	10 mM Na-fosfátový pufr	7 mg·ml ⁻¹	přímé
	DSPG	22				
	DMPE-2000 PEG 120 nm	3				
	NBD-PC	0,5				

Mezi použité lipidy patřil dipalmitoylfosfatidylcholin (DPPC), dipalmitoylfosfatidylglycerol (DPPG), distearoylfosfatidylcholin (DSPC), distearoylfosfatidylglycerol (DSPG), polyetylen glykolovaný dimyristoyl glycerofosfoethanolamin (DMPE-2000 PEG) a fosfatidylcholin značený 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-ylem (NBD-PC).

Při přímém přidání byl připraven nejprve lipidový film a k němu byl přidán 5FU rozpuštěný v pufru. Při nepřímé metodě byl 5FU navážen již k lipidům, celá směs se nechala rozpustit v organické fázi, kde došlo k vytvoření lipidového filmu, a nakonec byl přidán pufr bez 5FU.

4.7 Příprava vzorků k měření

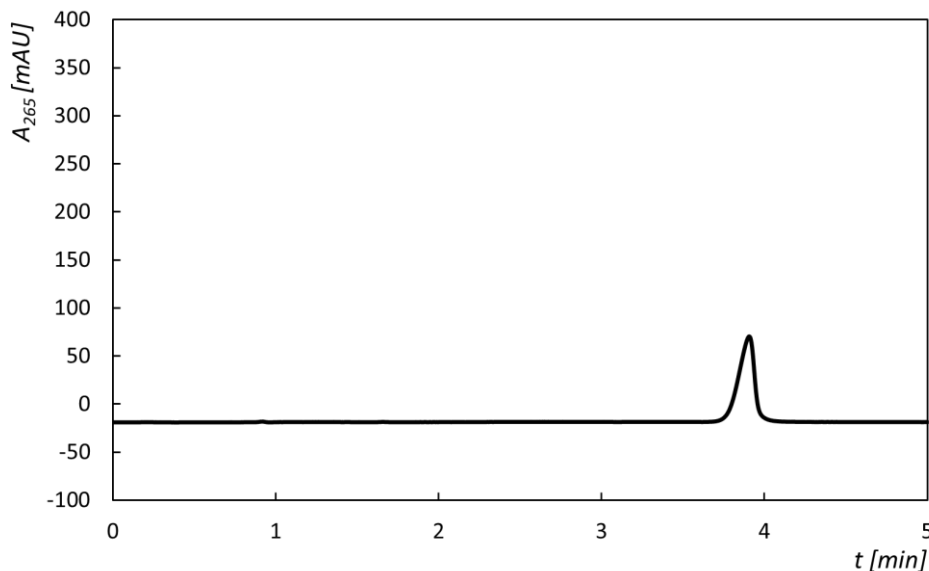
Ze zásobního roztoku obsahujícího příslušný typ liposomů bylo odebráno 50 μl , které se nechaly centrifugovat po dobu 10 minut rychlostí 13 500 otáček za minutu. Centrifugací se mělo docílit oddělení liposomů od zbytku roztoku ideálně tak, aby se ve vzniklém supernatantu nacházel jen volný 5FU. Ze supernatantu bylo odebráno 30 μl do vialky. Z těchto 30 μl bylo odebráno 10 μl , ke kterým bylo přidáno 90 μl deionizované vody, aby se dosáhlo desetinásobného zředění supernatantu. Tento naředěný roztok byl posléze zfiltrován za účelem odstranění se zbytkových liposomů a nakonec analyzován.

Nejzásadnější vliv na kvalitu stanovení 5FU ve vzorcích měla filtrace. Při opakovaném měření vzorku, který nebyl zfiltrován, docházelo k postupnému snižování zachyceného signálu. Nepomohlo ani navýšení časových intervalů mezi jednotlivými měřeními a ani promytí kolony MeOH. Jediným řešením při absenci filtrace vzorku bylo vymýt z kolony pufr s iontově párový činidlem směsí vody a methanolu a poté ji převést do čistého methanolu. Následně promýt směsí methanolu a vody, pak směsí methanolu a pufru s iontově párovým činidlem a až poté pokračovat v měření vzorků. Příčinou bylo pravděpodobně to, že část liposomů nebo jejich složek zůstala po centrifugaci v supernatantu a začala zanášet kolonu.

V rámci optimalizace metody byl vyzkoušen ještě krok, při kterém byl vzorek před centrifugací 30 minut ponechán v ultrazvukové lázni. Ukázalo se ale, že zapojení ultrazvukové lázně nemělo na výsledky žádný větší vliv, a proto bylo od tohoto kroku upuštěno.

4.8 Stanovení volného 5FU ve vzorcích

Roztoky vzorků liposomů byly měřeny pokaždé v triplikátech. Pro ilustraci byl vybrán chromatogram vzorku GN400 (Obr. 23), na kterém je vidět, že nedocházelo k žádné interferenci signálu 5FU a ani k deformaci jeho píku.



Obr. 23: Vzorek GN400. Podmínky: průtok $0,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; objem nástřiku $1 \mu\text{l}$. Složení MF: 98/2 $10 \text{ mM CH}_3\text{COONH}_4$ pH 8,0 s 5 mM TBAC hydrátem/MeOH. Kolona: Poroshell 120 Phenyl-hexyl ($100 \times 2,1 \text{ mm}$; $2,7 \mu\text{m}$; 120 \AA); teplota kolony $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tab. 8: Statisticky zpracované chromatografické parametry získané opakovaným měřením vzorků liposomů.

		Čas [min]	Plocha [mAU·s]	Koncentrace [mmol·l ⁻¹]
GN100	medián	3,957	607,2	0,506
	SD	0,003	4,9	0,004
	RSD %	0,1	0,8	0,8
GN400	medián	3,953	594,1	0,496
	SD	0,024	3,8	0,003
	RSD %	0,6	0,6	0,6
120	medián	3,930	508,3	0,424
	SD	0,036	12,0	0,010
	RSD %	0,9	2,4	2,4
17.1	medián	3,947	500,0	0,417
	SD	0,005	3,7	0,003
	RSD %	0,1	0,7	0,7

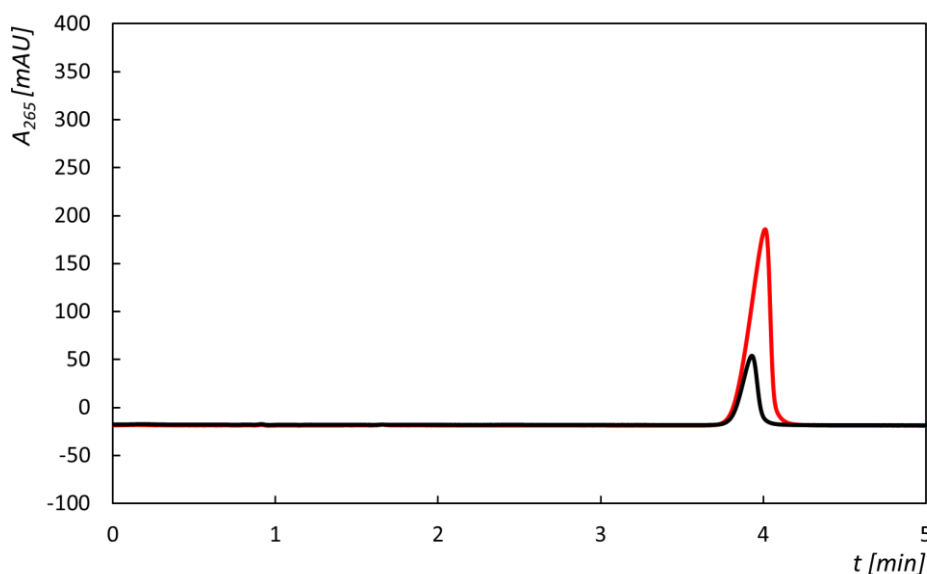
Na základě získaných ploch píků byly po dosazení do rovnice kalibrační závislosti vypočteny koncentrace volného 5FU pro každý ze vzorků. Z výsledků uvedených v tabulce (*Tab. 8*) vyplývá, že dvojice liposomů GN100 a GN400 měla velmi podobné hladiny volného 5FU okolo $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. U dvojice liposomů 120 a 17.1 byla zjištěna také velmi podobná koncentrace volného 5FU a to okolo $0,4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Co se týče konzistence naměřených ploch píků, a tedy i stanovené koncentrace 5FU, tak k nejvyšším odchylkám došlo při měření vzorku 120, kdy relativní směrodatná odchylka vypočítaných koncentrací dosáhla hodnoty 2,4 %. Relativní směrodatné odchylky vypočítaných koncentrací zbylých vzorků se pohybovaly v rozmezí 0,6 – 0,8 %, což jsou ve všech případech velmi příznivé hodnoty.

Ve vzorku liposomů označených kódem GN100 byla zjištěna koncentrace volného 5FU $0,506 \pm 0,005 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (0,8 %). Zjištěná koncentrace volného 5FU v liposomech GN400 byla $0,496 \pm 0,004 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (0,6 %). Koncentrace volného 5FU v liposomech typu 120 byla stanovena na $0,424 \pm 0,011 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (2,4 %) a v liposomech typu 17.1 na $0,417 \pm 0,004 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (0,7 %).

4.9 Ověření správnosti fungování metody v reálném vzorku

Pro potvrzení správnosti fungování metody při měření reálného vzorku byl k zpracovanému vzorku 120 přidán 1 mM standard 5FU. Původní zjištěná koncentrace 5FU ve vzorku by se měla tedy navýšit o nově přidané množství. Měření byla provedena v triplicátech a níže je uveden chromatogram jednoho měření bez přídavku a jednoho měření s přídavkem 5FU jako reprezentativní příklad (Obr. 24).



Obr. 24: Vzorek 120 (černá) a vzorek 120_F s přidaným 1 mM roztokem standardu 5FU (červená). Podmínky: průtok $0,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; objem nástřiku $1 \mu\text{l}$. Složení MF: 98/2 10 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, $\text{pH} = 8,0$ s 5 mM TBAC hydrátem/MeOH. Kolona: Poroshell 120 Phenyl-hexyl ($100 \times 2,1 \text{ mm}$; $2,7 \mu\text{m}$; 120 \AA); teplota kolony $25 \text{ }^\circ\text{C}$

Jak bylo již uvedeno v minulé kapitole, koncentrace 5FU ve vzorku 120 byla $0,424 \pm 0,011 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (2,4 %). Ve vzorku 120_F s přidaným 1 mM roztokem standardu 5FU, byla stanovena koncentrace 5FU na $1,478 \pm 0,029 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (1,7 %). Rozdíl v koncentracích vzorku 120 a vzorku 120_F byl zhruba $1,054 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a odpovídal tedy přidanému množství standardu. Výťažnost stanovení byla 105,4 %

4.10 Účinnost enkapsulace

Účinnost enkapsulace jednotlivých typů liposomů byla vypočítána dosazením celkové koncentrace přidaného 5FU a zjištěné koncentrace volného 5FU do příslušného *Vzorce 2*. V tabulce (*Tab. 9*) jsou uvedeny vypočítané účinnosti enkapsulace uvedené v procentech.

Tab. 9: Účinnost enkapsulace 5FU ve čtyřech vzorcích liposomů.

	Koncentrace volného 5FU [mmol·l ⁻¹]	Účinnost enkapsulace [%]
GN100	0,506	90,6
GN400	0,496	90,8
120	0,424	92,1
17.1	0,417	92,2

Účinnost enkapsulace 5FU ve vzorku obsahujícím liposomy GN100 byla 90,6 % a vzorku obsahujícím liposomy GN400 90,8 %. Vzorek s liposomy 120 dosáhl účinnosti enkapsulace 92,1 % a vzorek s liposomy 17.1 dosáhl účinnosti 92,2 %.

Účinnost enkapsulace tedy byla u všech čtyřech liposomů podobná. O něco vyšší byla ale u dvojice liposomů GN100 a GN400. Všeobecně se jednalo ale o poměrně vysoké hodnoty.

5 Závěr

Hlavním cílem této diplomové práce byl vývoj a zoptimalizování metody na stanovení 5FU s použitím dostupných chromatografických kolon a dostupného technického vybavení. Vyvinutou metodou měla být poté měřena účinnost enkapsulace vzorků čtyř různých typů liposomů, kde byl 5FU stanovován v přítomnosti zbytků liposomů.

Z celkem osmi testovaných kolon byla pro stanovení 5FU nejvhodnější fenyl-hexylová Poroshell 120 Phenyl-hexyl (100 × 2,1 mm; 2,7 μm; 120 Å)

temperovaná na teplotu 25 °C. Mobilní fáze byla složena z 10 mM CH₃COONH₄, pH = 8,0 s příměsí 5 mM hydrátu chloridu tetrabutylamonného a MeOH v poměru 98/2.

Větší část optimalizačního procesu se skládala ze snah prodloužit až příliš krátké retenční časy 5FU na testovaných kolonách. Problém spočíval v eluci 5FU blízko mrtvého času kolon, kde hrozí eluce nečistot, které by mohly nepříznivě ovlivnit výsledky. Hlavní zásluhu na prodloužení retenčního času 5FU mělo přidání iontově párového činidla, v tomto případě 5 mM hydrátu chloridu tetrabutylamonného.

Iontově párové činidlo sice umožnilo dostatečné posunutí retenčního času 5FU, znesnadnilo ale použití metody na chromatografu napojeném na hmotnostní detektor, kde hrozilo potenciální zanesení zmíněného detektoru iontově párovým činidlem. Z tohoto důvodu je metoda více uzpůsobena chromatografu s UV-VIS detektorem. V souvislosti s použitím iontově párového činidla bylo zvýšeno pH mobilní fáze tak, aby se dosáhlo ionizace 5FU, a tak i zlepšení účinnosti iontově párového činidla.

Opakovatelnost metody byla měřena pro dvě koncentrace 0,05 a 0,5 mmol·l⁻¹ 5FU. RSD retenčních časů byla pro obě koncentrace 5FU 0,05 %. RSD ploch píků pro koncentraci 0,05 mmol·l⁻¹ byla 1,5 % a pro vyšší koncentraci 0,5 mmol·l⁻¹ 0,5 %. Pro vyvinutou metodu byly stanoveny také hodnoty LOD a LOQ 5FU. LOD byla stanovena na 4 μmol·l⁻¹ a LOQ na 14 μmol·l⁻¹.

Při práci s reálnými vzorky 5FU v přítomnosti liposomů se jako zásadní část přípravy ukázalo přefiltrování vzorků před samotným stanovením množství volného 5FU. Bez kroku filtrace vzorků docházelo k postupnému snižování signálu pravděpodobně způsobenému záchytem liposomů a jejich zbytků na koloně.

Množství volného 5FU bylo stanoveno ve vzorcích celkem čtyř typů liposomů, které se mezi sebou lišily například v použitých lipidech, jejich poměrech anebo pufrům použitým při přípravě. Na základě zjištěného množství

volného 5FU byly vypočítány účinnosti enkapsulace pro všechny vzorky. Liposomy označené kódem GN100 měly účinnost enkapsulace 5FU 90,6 %. Liposomy GN400 měly účinnost enkapsulace rovnou 90,8 %. Liposomy s označením 120 měly účinnost enkapsulace 5FU 92,1 % a liposomy označené 17.1 ji měly rovnou 92,2 %.

Seznam použité literatury

- (1) Nováková, L.; Douša, M.; Blatný, P.; Jandera, P.; Planeta, J.; Maier, V.; Znaležiona, J. *Moderní HPLC v Teorii a Praxi*, 1st ed.; Europrint a.s: Praha, 2013; Vol. 1.
- (2) Vacek, J.; Onofrejová, L.; Klejdus, B.; Kubáň, V. VYUŽITÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE ZALOŽENÉ NA HYDROFILNÍCH INTERAKCÍCH PRO SEPARACI POLÁRNÍCH LÁTEK. *Chemické listy* **2009**, *103* (5), 381–385.
- (3) *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*. <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/small-molecule-hplc/hilic#hilicmechanism> (accessed 2024-02-11).
- (4) Douša, M. *IONTOVÁ PÁROVÁ CHROMATOGRAFIE (ION PAIR CHROMATOGRAPHY)*. <http://www.hplc.cz> (accessed 2024-02-26).
- (5) Grem, J. L. 5-Fluorouracil: Forty-plus and Still Ticking. A Review of Its Preclinical and Clinical Development. *Invest New Drugs* **2000**, *18*, 299–313.
- (6) Zhang, N.; Yin, Y.; Xu, S. J.; Chen, W. S. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. *Molecules* **2008**, *13* (8), 1551–1569. <https://doi.org/10.3390/molecules13081551>.
- (7) Ewert de Oliveira, B.; Junqueira Amorim, O. H.; Lima, L. L.; Rezende, R. A.; Mestnik, N. C.; Bagatin, E.; Leonardi, G. R. 5-Fluorouracil, Innovative Drug Delivery Systems to Enhance Bioavailability for Topical Use. *J Drug Deliv Sci Technol* **2021**, *61*. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102155>.
- (8) *Fluorouracil*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3385> (accessed 2024-03-08).
- (9) *Fluorouracil (5FU)*. <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/treatment/drugs/fluorouracil> (accessed 2024-05-08).

- (10) Ganti, V.; Walker, E. A.; Nagar, S. Pharmacokinetic Application of a Bio-Analytical LC-MS Method Developed for 5-Fluorouracil and Methotrexate in Mouse Plasma, Brain and Urine. *Biomedical Chromatography* **2013**, *27* (8), 994–1002.
<https://doi.org/10.1002/bmc.2893>.
- (11) Chen, W.; Shen, Y.; Rong, H.; Lei, L.; Guo, S. Development and Application of a Validated Gradient Elution HPLC Method for Simultaneous Determination of 5-Fluorouracil and Paclitaxel in Dissolution Samples of 5-Fluorouracil/Paclitaxel-Co-Eluting Stents. *J Pharm Biomed Anal* **2012**, *59* (1), 179–183.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.10.005>.
- (12) Ciccolini, J.; Mercier, C.; Blachon, M. F.; Favre, R.; Durand, A.; Lacarelle, B. A Simple and Rapid High-Performance Liquid Chromatographic (HPLC) Method for 5-Fluorouracil (5-FU) Assay in Plasma and Possible Detection of Patients with Impaired Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPD) Activity. *J Clin Pharm Ther* **2004**, *29* (4), 307–315.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2710.2004.00569.x>.
- (13) SINHA, V. R.; KUMAR, R. V.; BHINGE, J. R. A Stability-Indicating RP-HPLC Assay Method for 5-Fluorouracil. *Indian J Pharm Sci* **2009**.
<https://doi.org/10.4103/0250-474X.59544>.
- (14) Micoli, G.; Turci, R.; Arpellini, M.; Minoia, C. Determination of 5-Fluorouracil in Environmental Samples by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *Journal of Chromatography B* **2001**, *750*, 25–32.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00377-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00377-7).
- (15) Gu, Y.; Lu, R.; Si, D.; Liu, C. Determination of 5-Fluorouracil in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Transactions of Tianjin University* **2010**, *16* (3), 167–173.
<https://doi.org/10.1007/s12209-010-0031-4>.

- (16) Nakhaei, P.; Margiana, R.; Bokov, D. O.; Abdelbasset, W. K.; Jadidi Kouhbanani, M. A.; Varma, R. S.; Marofi, F.; Jarahian, M.; Beheshtkhoo, N. Liposomes: Structure, Biomedical Applications, and Stability Parameters With Emphasis on Cholesterol. *Front Bioeng Biotechnol* **2021**, *9*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.705886>.
- (17) Wikimedia Commons. *Liposome_cross_section_flopped.png*. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/80/Liposome_cross_section_flopped.png (accessed 2024-03-01).
- (18) Sannikova, N.; Olaizola, A. *Effects of Concentrating Cannabinoid Loaded Liposome Formulations*. <https://www.pharmaexcipients.com/news/cannabinoid-liposome-formulations/> (accessed 2024-03-01).
- (19) Fan, Y.; Marioli, M.; Zhang, K. Analytical Characterization of Liposomes and Other Lipid Nanoparticles for Drug Delivery. *J Pharm Biomed Anal* **2021**, *192*. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113642>.
- (20) Barenholz, Y. Doxil® - The First FDA-Approved Nano-Drug: Lessons Learned. *Journal of Controlled Release* **2012**, *160* (2), 117–134. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>.
- (21) Bonechi, C.; Donati, A.; Tamasi, G.; Pardini, A.; Rostom, H.; Leone, G.; Lamponi, S.; Consumi, M.; Magnani, A.; Rossi, C. Chemical Characterization of Liposomes Containing Nutraceutical Compounds: Tyrosol, Hydroxytyrosol and Oleuropein. *Biophys Chem* **2019**, *246*, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2019.01.002>.
- (22) de Souza Von Zuben, E.; Eloy, J. O.; Sousa Araujo, V. H.; Daflon Gremião, M. P.; Chorilli, M. Rapid and Sensitive Analytical Method for the Determination of Insulin in Liposomes by Reversed-Phase HPLC. *Acta Chim Slov* **2020**, *67* (4), 1273–1280. <https://doi.org/10.17344/acsi.2020.6177>.

- (23) *Kinetex PS C18 Core-Shell HPLC Columns*.
<https://www.phenomenex.com/products/kinetex-hplc-column/kinetex-ps-c18#how%20it%20works> (accessed 2024-03-06).
- (24) *InfinityLab Poroshell 120*. <https://www.agilent.com/store/undefined/Prod-695775-912/695775-912> (accessed 2024-03-08).
- (25) Marchand, D. H.; Croes, K.; Dolan, J. W.; Snyder, L. R.; Henry, R. A.; Kallury, K. M. R.; Waite, S.; Carr, P. W. Column Selectivity in Reversed-Phase Liquid Chromatography: VIII. Phenylalkyl and Fluoro-Substituted Columns. *J Chromatogr A* **2005**, *1062* (1), 65–78.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.11.014>.
- (26) *ACQUITY UPLC CSH Fluoro-Phenyl Column, 130Å, 1.7 μm, 2.1 mm X 100 mm, 1/pk*.
<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186005352-acquity-uplc-csh-pfp-fluoro-phenyl-column-130a-17--m-21-mm-x-100.html>
(accessed 2024-03-20).
- (27) *ACQUITY UPLC BEH Amide Column, 130Å, 1.7 μm, 2.1 mm X 100 mm, 1/pk*. <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186004801-acquity-uplc-beh-amide-column-130a-17--m-21-mm-x-100-mm-1-pk.html>
(accessed 2024-03-22).