

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie

**Stanovení neopterinu a jeho derivátů metodou HPLC
s fluorescenční detekcí**

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Hradec Králové, 2009

Lenka Říhová

NÁZEV:

Stanovení neopterinu a jeho derivátů metodou HPLC s fluorescenční detekcí

ABSTRAKT:

Neopterin, derivát pteridinu, je v lidském organismu produkován monocyty nebo B - lymfocyty po stimulaci interferonem γ , nebo interleukinem – 2. Tyto působky (interferon γ , interleukin – 2) jsou spojeny s aktivací imunitního systému. Měření neopterinu v tělních tekutinách tedy může sloužit při monitorování cytokiny indukované aktivace různých složek imunitního systému. Imunitní aktivace se objevuje například v průběhu mnoha infekčních chorob, při autoimunitních onemocněních a při maligních onemocněních. V poslední době je ve vědeckých pracích popisována také spojitost neopterinu a 7,8 – dihydroneopterinu s intracelulárním oxidativním stresem a apoptózou buněk. Pteridiny tudíž mají pravděpodobně vztah i k určitým neurologickým onemocněním. Plně redukováná forma biopterinu se v lidském organismu uplatňuje jako kofaktor některých enzymů. Koncentrace neopterinu, případně jiných příbuzných látek, se v klinické praxi vyjadřuje poměrem neopterin / kreatinin. Tato diplomová práce se zabývá vypracováním analytické metody určené k identifikaci a stanovení biologicky aktivních látek biopterinu, 7,8 – dihydroneopterinu, 5,6,7,8 – tetrahydroneopterinu, neopterinu a kreatininu za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) ve spojení s fluorescenční, respektive UV detekcí v případě kreatininu.

KLÍČOVÁ SLOVA:

Biopterin, 7,8 – dihydroneopterin, 5,6,7,8 – tetrahydroneopterin, neopterin, kreatinin, HPLC, HILIC

TITLE:

Determination of neopterin and its derivatives by HPLC with fluorescence detection

SUMMARY:

Neopterin, a pteridine derivative, is produced in human organism by monocytes or by B - lymphocytes stimulated with interferon γ or interleukine - 2. These active substances (interferon γ , interleukine - 2) are connected with immune system activation. Neopterin measurement in body fluids can therefore serve for monitoring of activation of various components of immune system induced by cytokines. Immune activation occurs for example during many infectious diseases, autoimmune diseases and malignant diseases. Recently the connection between neopterin and 7,8 - dihydroneopterin and intracellular oxidative stress and cell apoptosis was demonstrated in several scientific studies. Values of pteridines probably correlate with certain neurological diseases. Totally reduced form of biopterin serves as cofactor of some enzymes in human organism. In clinical practice the concentration of neopterin, eventually other related substances is expressed as the ratio neopterin / creatinine. This diploma thesis is dealing with the development of an analytical method for the determination of biologically active substances biopterin, 7,8 - dihydroneopterin, 5,6,7,8 - tetrahydroneopterin, neopterin and creatinine by high performance liquid chromatography connected to fluorescence, respectively UV detection in case of creatinine.

KEYWORDS:

Biopterin, 7,8 - dihydroneopterin, 5,6,7,8 - tetrahydroneopterin, neopterin, creatinine, HPLC, HILIC

Největší dík patří PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, za její kolegiální a vstřícný přístup a za všechny čas, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům Katedry analytické chemie za poskytnutí laboratoře a také, že mi byli kdykoliv nápomocni. Nakonec děkuji všem, kteří mě podporovali během vypracování diplomové práce.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a jsou v práci řádně citovány.

V Rokycanech dne 1. 5. 2009

.....
Lenka Říhová

OBSAH

OBSAH.....	6
SEZNAM ZKRATEK.....	9
1. ÚVOD.....	10
2. CÍL PRÁCE.....	12
3. TEORETICKÁ ČÁST	14
3.1. Pteridiny.....	15
3.1.1. Historie a výskyt	15
3.1.2. Chemická struktura a chemické vlastnosti.....	15
3.1.3. Biosyntéza biopterinu a jeho redukovaných forem	16
3.1.4. Biosyntéza neopterinu a jeho redukovaných forem.....	16
3.1.5. Regulace biosyntézy	17
3.1.6. Význam biopterinu a jeho redukovaných forem.....	17
3.1.7. Význam neopterinu a jeho redukovaných forem	17
3.2. Kreatinin	18
3.2.1. Biosyntéza.....	18
3.2.2. Biologický a klinický význam	19
3.3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	19
3.3.1. Analýza látek pomocí kapalinové chromatografie	22
3.3.2. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC).....	24
3.4. Analytické kolony použité v této práci	27
3.4.1. Analytická kolona ZIC – HILIC	27
3.4.2. Analytická kolona SUPELCO SIL LC – SCX	29
3.4.3. Analytická kolona Discovery Zr – PBD	29
3.4.4. Analytická kolona Discovery Zr – CarbonC18	30
3.5. Validace analytické metody.....	30
3.5.1. Test způsobilosti systému	31
3.5.2. Vlastní validace analytické metody	32
3.6. Přehled publikovaných metod pro stanovení pteridinů a kreatininu	34
3.6.1. Stanovení pteridinů a kreatininu metodou HPLC.....	34
3.6.2. Stanovení pteridinů a kreatininu jinými metodami.....	36
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
4.1. Přístrojové vybavení	38
4.2. Chemikálie	38
4.3. Příprava roztoků.....	39

4.3.1.	Příprava roztoků pro analýzu	39
4.3.2.	Příprava vodných složek mobilní fáze	40
4.4.	Vývoj metody – optimalizace chromatografických podmínek	43
4.4.1.	Schéma práce v experimentální části	43
5.	VÝSLEDKY A DISKUSE	48
5.1.	Vývoj metody – optimalizace chromatografických podmínek	49
5.1.1.	Testování kolony ZIC – HILIC	49
5.1.2.	Testování kolony SUPELCOSIL LC – SCX	61
5.1.3.	Testování kolony Discovery Zr – PBD	64
5.1.4.	Testování kolony Discovery Zr – CarbonC18	67
5.2.	Validace metody HILIC	70
5.2.1.	Test způsobilosti systému	71
5.2.2.	Linearita a rozmezí kalibrace	73
5.3.	Stanovení sledovaných látek v biologickém materiálu	75
6.	ZÁVĚR	82
7.	LITERATURA	86

SEZNAM ZKRATEK

AcAc	Acetic acid; kyselina octová
ACN	acetonitril
AmAc	Ammonium acetate; octan amonný
ATP	adenosintrifosfát
BIO	biopterin
DAD	Diode – array detector; detektor s diodovým polem
DHN	7,8 - dihydroneopterin
GTP	guanosintrifosfát
HILIC	Hydrophilic interaction liquid chromatography
HPLC	High performance liquid chromatography; vysokoúčinná kapalinová chromatografie
KRE	kreatinin
NEO	neopterin
NO	oxid dusnatý
SST	System suitability test; test způsobilosti systému
THN	5,6,7,8 - tetrahydroneopterin
TNF	tumor nekrotizující faktor
UV	Ultraviolet; ultrafialová oblast
VIS	viditelná oblast světla

1. ÚVOD

Metoda HILIC je jednou z variant vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Jedná se o znovu objevenou metodu, která v současné době s vývojem nových stacionárních fází nabývá na významu. HILIC je variantou chromatografie na normálních fázích s tím rozdílem, že používá vodu společně s organickým rozpouštědlem mísitelným s vodou jako eluent ve spojení s hydrofilní stacionární fází. Mezi nejproblematictější analyty z pohledu chromatografie se řadí sloučeniny vysoce polární a bazické. A právě metodu HILIC lze s úspěchem aplikovat na analýzu látek tohoto typu, a to i tam, kde jiné chromatografické módy selhávají. Metoda HILIC se používala zejména pro analýzu oligosacharidů, z dalších látek to byly například glykopeptidy a saponiny. V současné době nachází uplatnění i v analýze cytostatik a antibiotik, toxinů, syntetických polymerů, metabolitů, aminokyselin, peptidů a proteinů.

2. CÍL PRÁCE

Tato diplomová práce se zabývá analýzou biologicky aktivních látek biopterinu, 7,8 – dihydroneopterinu, 5,6,7,8 – tetrahydroneopterinu, neopterinu a kreatininu pomocí HPLC s fluorescenční, respektive UV detekcí v případě kreatininu.

Cílem této práce bylo vyvinout HPLC metodu pro stanovení všech pěti zkoumaných látek současně. Tato metoda by pak měla být použitelná ve Fakultní nemocnici Hradec Králové pro rychlé a jednoduché stanovení zmiňovaných látek v biologických vzorcích. Jedním z dílčích cílů bylo také zjistit retenční chování neopterinu a kreatininu v systému HILIC. V rámci hledání optimálních chromatografických podmínek budou zkoušeny celkem čtyři chromatografické kolony, jedna určená pro metodu HILIC a tři určené pro separace polárních látek a bude tak hledáno optimální složení mobilní fáze. Po nalezení optimálních chromatografických podmínek pro analýzu směsi standardů bude proveden test způsobilosti systému a ověření linearity pro jednotlivé látky, což bude umožňovat jejich stanovení. Nakonec bude vyvinutá metoda aplikována na reálné vzorky moči a bude provedena kvantifikace nalezených látek s porovnáním našich výsledků s výsledky získanými metodou používanou v nemocnici, která dosud umožňovala pouze stanovení neopterinu.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1.Pteridiny

3.1.1. Historie a výskyt

Počátek historie pteridinů se datuje do roku 1889, kdy Hopkins izoloval žlutý pigment z křídel lepidoptera. Skupina těchto pigmentů pak dostala obecný název pteridiny podle řeckého „ pteron “ (křídlo) [1].

Vysoké koncentrace pteridinů se nacházejí pouze jako pigmenty u hmyzu, ryb, obojživelníků a plazů. Například v očích hmyzu působí pravděpodobně jako ochranné filtry a mohou fungovat jako světelné receptory. U člověka byly pteridiny nejprve detekovány v moči, kde se vyskytují v relativně vysokých koncentracích, a to především biopterin a neopterin [1, 2].

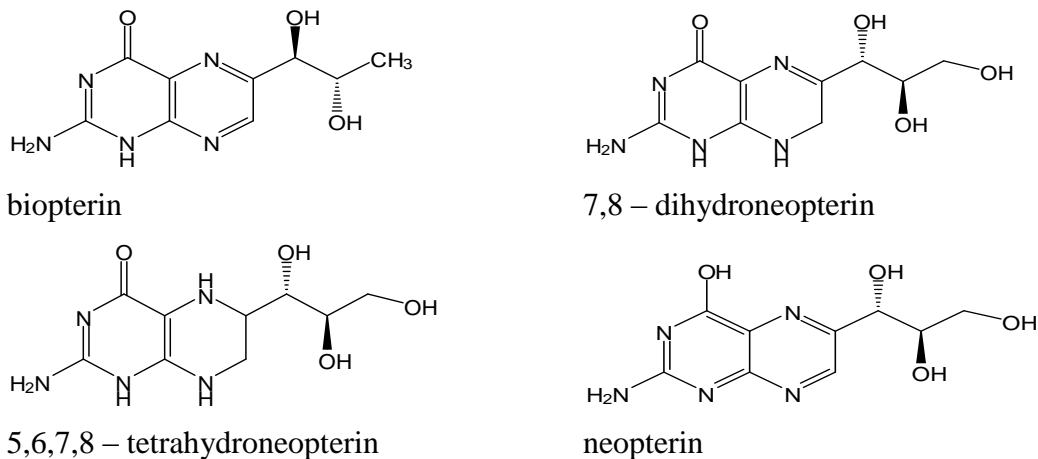
Pteridinů existuje velké množství, avšak jen u několika byla popsána jejich biologická funkce: například biopterin stimuluje mitózu u trypanosomy, jeho redukovaná forma 5,6,7,8 – tetrahydrobiopterin se uplatňuje jako kofaktor monooxygenas aromatických aminokyselin a NO – synthasy. Funkce neopterinu není dosud zcela objasněna. Sledování jeho koncentrace v tělních tekutinách pomáhá předvídat vývoj patologického stavu spojeného s aktivací buněčného imunitního systému [1].

3.1.2. Chemická struktura a chemické vlastnosti

Základem struktury těchto látek je sloučenina pteridin, podle které je celá skupina obecně pojmenována a která se dá popsat jako pyrazino - [2,3 – d] – pyrimidinový bicyklický systém. Deriváty pteridinu se podle substituce pyrimidinového cyklu dělí na pteriny a lumaziny. Z jiného hlediska se dají dělit na nekonjugované (s relativně malými substituenty), kam patří například neopterin, biopterin, a na konjugované, obsahující větší substituenty vázané na pteridinový cyklus, kam se dá zařadit například kyselina listová, riboflavin.

Jedná se o fotosenzitivní sloučeniny, které se na světle rozkládají na různé deriváty pteridinu. Mohou existovat ve třech oxidačních formách: jako redukovaný tetrahydropteridin, jako částečně oxidovaný dihydropteridin nebo jako plně oxidovaná (aromatická) forma pteridinu. Redukované formy snadno podléhají oxidaci vzdušným kyslíkem, zejména v přítomnosti iontů kovů. Z toho vyplývá, že redukované formy mají

tedy silné antioxidační účinky a mohou působit jako lapače reaktivních forem kyslíku. Biopterin a neopterin se dají připravit ze svých redukovaných forem také oxidací jodem. Naproti tomu pouze oxidované formy vykazují silnou modrou fluorescenci. Biopterin a neopterin včetně svých různých oxidačních stavů mají podobná UV spektra [1].



Obr. 1.: Chemické struktury pteridinů

3.1.3. Biosyntéza biopterinu a jeho redukovaných forem

Výchozí sloučeninou pro biosyntézu všech pteridinů je GTP. Biosyntéza tetrahydrobiopterinu probíhá ve třech krocích, které jsou všechny katalyzovány enzymy. Nejdříve se molekula GTP štěpí na D – erythro – 7,8 – dihydroneopterintrifosfát, což je také klíčový intermediát v biosyntéze většiny ostatních pteridinů. Po sledu tří reakcí je produktem 6R – L – erythro – 5,6,7,8 – tetrahydrobiopterin. Biosyntéza tetrahydrobiopterinu se uskutečňuje především v hepatocytech, lymfocytech a v dopaminergních a serotoninergních synapsích [1].

3.1.4. Biosyntéza neopterinu a jeho redukovaných forem

V lidských hepatocytech je aktivita enzymu, který má při biosyntéze tetrahydrobiopterinu jako substrát 7,8 – dihydroneopterintrifosfát, nižší než u ostatních savců. Daný enzym pak úplně chybí v lidských monocytech (makrofázích). Následkem je hromadění 7,8 – dihydroneopterintrifosfátu v buňkách, který je potom přetvářen na 7,8 – dihydroneopterin a neopterin [1].

Monocyty jsou schopné ve zvýšené míře produkovat neopterin, ale pouze jako odpověď na působení interferonu γ , který je uvolňován z aktivovaných T – lymfocytů. U aktivovaných makrofágů je poměr celkového neopterinu k celkovému biopterinu

přibližně 50 : 1. Neopterin může být produkován také B – lymfocyty, pokud na ně působí interferon γ nebo interleukin – 2. Oba působky pracují v tomto ohledu nezávisle na sobě. B – lymfocyty jsou výkonnějšími producenty neopterinu než monocyty [1, 3, 4].

3.1.5. *Regulace biosyntézy*

Regulace biosyntézy pteridinů se děje různými mechanismy většinou na úrovni prvního enzymu, který je zodpovědný za tvorbu klíčového intermediátu. Obecně platí, že prozánětlivé cytokiny stimulují biosyntézu pteridinů. Nejúčinnějším stimulem je interferon γ , silným kostimulátorem je TNF – α , který ale nemá tento účinek sám o sobě. Některé hormony jako inzulin a glukokortikoidy stimulují biosyntézu tetrahydrobiopterinu. Naopak inhibičně na tvorbu pteridinů v organismu působí protizánětlivé cytokiny jako například interleukiny 4 a 10 [1].

3.1.6. *Význam biopterinu a jeho redukovaných forem*

Pteriny obecně se podílejí na biologických oxidacích. Úloha tetrahydrobiopterinu v metabolismu byla studována u monooxygenas aromatických aminokyselin a bylo zjištěno pět enzymů, jejichž aktivita závisí na tetrahydrobiopterinu. Ten je redoxním kofaktorem těchto enzymů. Pouze plně redukovaná forma biopterinu je v enzymech aktivní, protože má schopnost se oxidovat. Tetrahydrobiopterin, který je ve zvýšené míře produkován aktivovanými lymfocyty, zároveň zvyšuje jejich afinitu k interleukinu – 2, což vede k jejich zvýšené proliferaci. Dále se podílí na řízení buněčného cyklu a na regulaci melanogeneze. Biopterin je nejčastěji se vyskytující pterinová sloučenina [1, 2, 5].

3.1.7. *Význam neopterinu a jeho redukovaných forem*

Aktivace imunitního systému je alespoň částečně zprostředkována cytokiny. Ty je ale obtížné kvantifikovat v pacientově séru nebo plazmě. Měření neopterinu v tělních tekutinách může sloužit při monitorování lymfokiny indukované aktivace různých složek imunitního systému, neopterin tedy nemá sám o sobě žádnou imunologickou funkci. Generalizovaná imunitní aktivace (projevující se mimo jiné zvýšením hladin

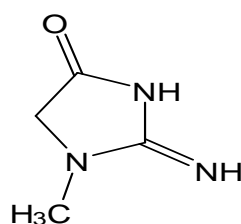
neopterinu) se objevuje v průběhu mnoha infekčních chorob, při autoimunitních onemocněních, při rejekčních reakcích transplantované tkáně a při maligních onemocněních. Vzestup hladin neopterinu byl například pozorován konkrétně při revmatických onemocněních, při leukémii, cytomegalovirové infekci, hepatitidě, mononukleóze, HIV infekci. Zvýšené množství neopterinu v moči bylo pozorováno u lidí trpících fenylketonurií [3, 4, 6].

V poslední době se objevila řada prací spojujících neopterin a 7,8 – dihydroneopterin s intracelulárním oxidativním stresem, případně i s apoptózou, způsobenou tímto oxidativním stresem. V návaznosti na tato pozorování se výzkum v oblasti pteridinů obrací v současné době k takovým onemocněním, jako je neurodegenerativní onemocnění mozku, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba a některé další nemoci provázené ztrátami a změnami nervových buněk [6].

3.2. Kreatinin

3.2.1. Biosyntéza

Kreatinin vzniká jako konečný produkt energetického metabolismu svalů, a to neenzymovou dehydratací kreatinu nebo kreatinfosfátu. Kreatin je syntetizován ze tří aminokyselin – glycinu, argininu a methioninu. Přenosem amidinové skupiny z argininu na glycin vzniká guanidinoacetát a ornithin. Kreatin je pak tvořen z guanidinoacetátu navázáním methylové skupiny pocházející z S – adenosylmethioninu. Na kreatin může být reverzibilně přenesena fosfátová skupina pocházející z ATP. Tak vznikne kreatinfosfát. Ten slouží jako zásoba energie při svalovém stahu. Koncovým produktem v metabolismu kreatinfosfátu je jeho anhydrid kreatinin. Kreatinin může být tvořen i přímo z kreatinu. Protože množství kreatinfosfátu je přímo úměrné svalové hmotě těla, je spontánní tvorba kreatininu charakteristická pro každého jedince [7, 8, 9].



Obr. 2.: Chemická struktura kreatininu

3.2.2. *Biologický a klinický význam*

Veškerý vyprodukovaný kreatinin je vylučován do moči. Za normálního stavu bývá poměr produkce a exkrece kreatininu konstantní a tento poměr se někdy slovně označuje jako S – kreatinin. Vyšší hodnoty S – kreatininu mají obecně lidé s vyšším podílem svalové hmoty, muži a mladší lidé. Zvýšení kreatininémie (koncentrace kreatininu v krvi) se objevuje také při tělesné námaze nebo po příjmu exogenního kreatininu (maso, masné výrobky). Koncentrace kreatininu naopak klesá v těhotenství (fyziologicky) a u osob s malou svalovou hmotou [7, 8, 10].

Stanovení S – kreatininu může být dobrým indikátorem funkce glomerulů. Patologicky začíná kreatininémie stoupat, když je glomerulární filtrace snížena pod 50%. Koncentrace kreatininu v krvi stoupá při glomerulonefritidách, ledvinovém selhání, při rhabdomyolýze (rozpad kosterního svalstva), při nefrotickém syndromu, nefrolitiázách, pyelonefritidách [7].

3.3. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Chromatografie obecně je separační metoda, umožňující rozdělení směsi na jednotlivé složky. Využívá se pro kvalitativní i kvantitativní analýzu složek směsi [11].

V chromatografii se vzorek vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární fáze je nepohyblivá, mobilní fáze je pohyblivá. V průběhu chromatografického procesu dochází k postupnému, mnohokrát opakovanému vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi stacionární a mobilní fází. Jednotlivé složky směsi mají různou afinitu k oběma fázím a na základě toho se od sebe separují a z chromatografického systému vycházejí odděleně. Větší podíl interakcí analytu se stacionární fází způsobuje jeho větší zadržování v chromatografickém systému, větší podíl interakcí s mobilní fází znamená rychlejší výstup analytu ze systému [11, 12].

Dnes existuje velké množství variant chromatografie. Z výukových důvodů a pro lepší orientaci se dají chromatografické metody dělit podle několika různých hledisek:

Podle skupenství mobilní fáze

- kapalinová chromatografie – mobilní fází je kapalina
- plynová chromatografie – mobilní fází je plyn

Podle uspořádání stacionární fáze

- kolonová chromatografie – stacionární fáze je umístěna v trubici = koloně
- plošné techniky:
 - papírová chromatografie – stacionární fáze je součástí chromatografického papíru
 - tenkovrstvá chromatografie – stacionární fáze je umístěna na pevném plochem podkladu (např. hliníkové folii)

Podle mechanismu separačního děje

- adsorpční chromatografie – o separaci rozhoduje různá schopnost složek vzorku adsorbovat se na povrch tuhé stacionární fáze
- rozdělovací chromatografie – o separaci rozhoduje odlišná rozpustnost složek vzorku ve stacionární (kapalina) a mobilní fázi (kapalina/plyn)
- iontovýměnná chromatografie – o separaci rozhodují různě velké elektrostatické přitažlivé síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze a ionty vzorku
- gelová chromatografie – stacionární fází je pórovitý gel a jednotlivé složky jsou rozdělovány na základě odlišné velikosti molekul
- afinitní chromatografie – stacionární fáze je schopna vázat ze vzorku právě určité složky, ke kterým má specifickou afinitu

Při separaci se uplatňuje několik fyzikálně – chemických dějů současně, ale jeden z nich převládá [12].

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Kapalinová chromatografie umožňuje ovlivňovat separaci jak volbou stacionární, tak i mobilní fáze, která se většinou aktivně účastní interakcí se separovanými látkami a se stacionární fází. To je rozdíl oproti chromatografii plynové, kde mobilní fáze působí pouze jako inertní nosné médium. Proto máme v kapalinové chromatografii větší možnost dosáhnout ideálních podmínek pro separaci směsi, a to i výběrem vhodné mobilní fáze [12, 13].

V klasické kapalinové chromatografii se používá skleněná trubice ve svislé poloze jako kolona a je naplněna zrnitým sorbentem s velkým průměrem částic. Do horní části trubice se dává vzorek a následně se přidává kapalná mobilní fáze. Působením gravitační síly postupuje mobilní fáze kolonou, složky vzorku se od sebe separují a v různých časech opouštějí spodní část kolony [12].

Dnes se používá modernější forma kolonové kapalinové chromatografie – vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC). Je třeba použít dostatečně malých

částic sorbentu, které kladou prostupující kapalině značný odpor. Proto je nutné pracovat při vysokém tlaku. V HPLC se uplatňují všechny možné mechanismy separace – adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, molekulově síťový efekt, specifické interakce v afinitní chromatografii [12, 13].

Adsorpční kapalinová chromatografie využívá mezimolekulových přitažlivých sil mezi stacionární fází a analytem. Rozpouštědlo i rozpuštěné látky soutěží o místa na povrchu stacionární fáze. Proto je vhodná volba rozpouštědla důležitá pro eluci analytu. Mobilní fáze by také neměla chemicky narušovat nebo vymývat fázi stacionární. Jako adsorbenty se používají například silikagel, oxid hlinitý, aktivní uhlí, celulosa. Je žádoucí velký povrch adsorbentů. Přítomnost vody v systému snižuje efektivitu adsorpce, neboť se váže na adsorpční místa. Adsorpční chromatografie je užitečná pro separaci nízko a středně polárních vzorků relativní molekulové hmotnosti do 1000 [12].

V rozdělovací kapalinové chromatografii se analyty rozdělují mezi dvě nemísitelné kapalně fáze. Stacionární fází je kapalina zakotvená na pevném nosiči. Nosičem je silikagel nebo sklo. Podmínkou je vzájemná nemísitelnost mobilní a stacionární fáze, jinak hrozí vymývání stacionární fáze z kolony. Retenční časy analytů závisí na tom, jak jsou rozpustné v obou fázích rozdílné polarity. Rozdělovací chromatografie je obecně nejvhodnější pro látky menších až středních molekulových hmotností. Přítomnost vody zde není překážkou [12].

Stacionární fází v iontovýměnné chromatografii je měnič iontů - ionex. Jde o polymer (polystyren, celulosa) s vhodnými funkčními skupinami kyselé nebo zásadité povahy. Tyto funkční skupiny jsou pevně navázány na matici a je na ně iontovou vazbou připojen protiiont s opačným nábojem. Ten může být nahrazen iontem obsaženým v mobilní fázi. Při tom se uplatňují elektrostatické přitažlivé síly mezi ionty opačného náboje (Coulombické síly). Iontoměniče se dělí na anexy a katexy. Anexy mají pevně navázané zásadité funkční skupiny (aminoskupiny, kvarterní amoniové báze) a slouží k výměně aniontů. Katexy mají kyselé funkční skupiny (sulfoskupiny, karboxylové skupiny) a slouží k výměně kationtů. Ionexy se silně kyselými nebo silně zásaditými funkčními skupinami jsou ionizovány v celé oblasti pH, slabé katexy pouze v alkalické a slabé anexy pouze v kyselé oblasti pH. Mezi různými ionty obecně se nejpevněji váže ten s největším nábojem a objemem. Mobilní fází bývají pufrы. Často se pracuje při zvýšené teplotě. Iontovýměnná chromatografie se používá jak k separaci slabých organických kyselin a zásad, tak i anorganických iontů [12, 13].

V gelové chromatografii jsou molekuly rozdělovány podle své velikosti. Látky se rozdělují mezi pohyblivou část mobilní fáze, která se nachází mezi jednotlivými zrny gelu, a nepohyblivou část mobilní fáze, nacházející se uvnitř pórů gelu. Molekuly se zdržují v chromatografickém systému na základě pronikání (permeace) do pórů gelu. Malé molekuly s menší molekulovou hmotností mají schopnost pronikat hlouběji a zdržují se tudíž v systému déle než větší molekuly. Interakce analytu se stacionární fází nenastávají. Gel se volí podle vlastností separovaných látek, taktéž mobilní fáze. Pro látky rozpustné ve vodě se používají hydrofilní gely, pro látky nerozpustné ve vodě hydrofobní gely. Existují také univerzální gely vhodné pro separaci hydrofobních i hydrofilních látek. Pracuje se s nižšími tlaky než v adsorpční nebo rozdělovací chromatografii. Gelová chromatografie je vhodná pro analyty relativní molekulové hmotnosti větší než 500, často se využívá pro biopolymery, např. proteiny [12].

Afinitní chromatografie využívá specifických interakcí typu antigen – protilátka, enzym – inhibitor [13].

Jedním z typů chromatografie definovaným mechanismem separace je v HPLC také metoda HILIC.

3.3.1. Analýza látek pomocí kapalinové chromatografie

Kapalinová chromatografie byla objevena při práci se směsí barevných látek, kterou se podařilo rozdělit na jednotlivé složky za použití polárních sorbentů (celulózná vlákna, anorganické oxidy) a tyto složky pak byly vymývány nepolárními organickými rozpouštědly. Tento původní způsob uspořádání byl pak nazván normální kapalinovou chromatografií neboli chromatografií na normálních fázích [14].

Když se později začaly objevovat kolony s chemicky modifikovanými stacionárními fázemi, byly zjišťovány značné výhody systému s opačnou polaritou, to znamená s hydrofobní stacionární fází a vodným roztokem organického rozpouštědla mísitelného s vodou. Proto se této metodě začalo říkat chromatografie na obrácených (reverzních) fázích. Postrádala nedostatky chromatografie na normálních fázích, využívající jako stacionární fázi anorganické oxidy, například pomalou ekvilibraci, špatnou rozpustnost analytů a často také frontující nebo chvostující píky. Chromatografie na obrácených fázích se také rozšířila z důvodu vhodnosti jejího použití pro širokou škálu bioanalytických vzorků.

Problém s nedostatečnou retencí některých polárních látek v konvenční chromatografii na obrácených fázích, který se nepodařilo odstranit ani použitím upravených polárnějších stacionárních fází, se dal v některých případech vyřešit nízkým přídavkem organického rozpouštědla do elučního činidla. Použití vysoce vodných elučních činidel je totiž často spojováno s nereprodukovatelnými retenčními časy a nízkou separační účinností. Nedostatečnou retenci v chromatografii na obrácených fázích nacházíme zejména u vysoce hydrofilních látek, jejichž polární funkční skupiny mají schopnost tvořit výhodně dipolární můstky s rozpouštědlem, neboli mají schopnost být solvatovány. Protože nepolární stacionární fáze neumožňují tvorbu takových vazeb, hydrofilní látky zůstávají v rozpouštědle a jsou eluovány s mrtvým objemem. Mezi funkční skupiny spojující se s hydrofilními sloučeninami patří jednak skupiny s nábojem a jednak skupiny schopné tvořit silné dipolární nebo vodíkové můstky. V případech, kdy nedostatečná retence je způsobena jednou nebo více funkčními skupinami, je vhodnou volbou iontovýměnná chromatografie. Využívá interakce zprostředkované náboji a může být použita prakticky pro všechny nabitě analyty. Alternativou k iontové výměně je iontové párování, které umožňuje použít kolony pro chromatografii na obrácených fázích. Vzrůst retence je pak zprostředkován iontově párovým činidlem, což je iontová sloučenina opačného náboje než analyzovaná látka. Iontově párová činidla se přidávají do mobilní fáze.

Mezi nejproblematictějšími analyty v chromatografii nacházíme sloučeniny vysoce hydrofilní a nenabitě. Separace plynovou chromatografií u nich není obvykle možná. Jedním způsobem, tradičně využívaným ke zvýšení retence sloučenin tohoto typu, je převedení jedné nebo více polárních funkčních skupin chemickou reakcí na hydrofobní skupiny. Tato technika označovaná jako derivatizace může navíc i zlepšit detekovatelnost. Derivatizace bývá výhodná, jestliže je derivatizována jediná a vysoce reaktivní skupina takovou reakcí, kterou dosáhneme kvantitativně jediného produktu za mírných reakčních podmínek. U analytů nesoucích více polárních skupin by reakce mohly vést k nežádoucím vedlejším produktům a neprobíhaly by kvantitativně. Nevýhodou je, že příbuzné sloučeniny mohou být po derivatizaci od sebe hůře separovány. Derivatizace je také časově náročná a vnáší nepřesnost do kvantitativní analýzy. V kapalinové chromatografii však existuje ještě dokonalejší způsob pro analýzu hydrofilních a nenabitých sloučenin, než je derivatizace. Mluvíme o metodě HILIC [14].

3.3.2. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC)*

Separace polárních látek na polárních stacionárních fázích za použití částečně vodných eluentů není v kapalinové chromatografii novinkou. První takové pokusy byly publikovány již před více než třiceti lety. Na počátku 90. let se pak začaly objevovat nové stacionární fáze a této technice byl dán anglický název Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC). Tato metoda si v poslední době získala popularitu, jednak z důvodu vzrůstající potřeby analyzovat polární složky ve směsích, jednak díky skutečnosti, že je možné metodu HILIC kombinovat s hmotnostní detekcí [14].

Akronym HILIC značí chromatografickou techniku, při níž analyty interagují s hydrofilní stacionární fází a zároveň jsou vymývány relativně hydrofobním dvousložkovým eluentem, v němž je voda silněji eluující složkou. Tato separační technika byla používána v kapalinové chromatografii již od roku 1975 pro analýzu oligosacharidů. Ještě předtím byly tyto hydrofilní stacionární fáze popsány jako iontoměničové pryskyřice obsahující na povrchu vodou obohacenou vrstvu. Podle jedné tehdejší teorie byla tato takzvaná stagnantní vodná vrstva určena k vázání neelektrolytů na iontoměničovou pryskyřici [14].

HILIC je založena na uspořádání, kde polární stacionární fáze je obohacena polárnější částí eluentu a zároveň celkové složení eluentu dovoluje rychlou distribuci analytu mezi tyto dvě fáze. Mechanismus separace v HILIC je vysvětlován jednak rozdělováním analytu mezi vodou obohacenou stagnantní vrstvu na hydrofilní stacionární fází a mezi relativně hydrofobní mobilní fází a jednak vznikem elektrostatických interakcí. Pro lepší porozumění retenčnímu mechanismu v HILIC by měla být i v budoucnu zkoumána role a struktura vody na povrchu separačních materiálů. Nutné použití vody v mobilní fází dává HILIC řadu výhod oproti běžné chromatografii na normálních fázích, např. příprava eluentu je méně náročná, jestliže nemusí být bezvodý [14, 15].

HILIC se v posledních několika letech jeví jako alternativní metoda při práci s polárními a hydrofilními analyty v případech, kde se neosvědčilo použití chromatografie na obrácených fázích. Ačkoliv chromatografie na obrácených fázích je obecně nejužívanější separační technikou a nachází řadu rozmanitých aplikací, určité analyty, obzvláště polární a hydrofilní sloučeniny, není možné jednoduchým způsobem zadržovat na chromatografické koloně. Dlouhou dobu byla metodou volby pro tyto případy chromatografie na normálních fázích, avšak problémem bylo rozpustit za takových podmínek polární a hydrofilní sloučeniny. Dá se říct, že HILIC je, co se týče

technického provedení, variantou chromatografie na normálních fázích s tím rozdílem, že používá vodu společně s organickým rozpouštědlem mísitelným s vodou (nejčastěji acetonitril) jako eluent ve spojení s hydrofilní stacionární fází. Z toho vyplývá, že retenční pořadí v HILIC bude opačné ve srovnání s pořadím analytů eluovaných při chromatografii na obrácených fázích, tzn. při použití metody HILIC jsou jednotlivé analyty ze systému eluovány v pořadí rostoucí hydrofility.

Typické eluenty pro HILIC se skládají ze 40 – 97% acetonitrilu ve vodě nebo těkavém pufru. Dají se však použít i další s vodou mísitelná organická rozpouštědla, například aceton nebo methanol. Vhodné pufrы pro HILIC jsou amonné soli octanu nebo mravenčanu kvůli jejich výborné rozpustnosti i při velmi vysokých koncentracích organického rozpouštědla, ale také kyselina mravenčí nebo octová. S opatrností se dají použít i fosfáty, které by při nevhodném použití mohly v systému precipitovat. Pokud je požadováno vysoké pH, použije se hydroxid amonný nebo uhličitán amonný. Pro většinu analýz je vhodná koncentrace pufru mezi 5 – 20 mmol/l. Negativně nebo pozitivně nabitě stacionární fáze vyžadují vyšší koncentrace pufru než neutrální a zwitteriontové stacionární fáze [14, 15].

V kapalinové chromatografii je nejběžnějším typem eluce izokratická. Pokud bychom i přesto chtěli v HILIC využít gradientovou eluci, dosáhneme toho vzrůstem polaritы mobilní fáze, snižováním koncentrace organického rozpouštědla, to znamená opačně ve srovnání s chromatografií na obrácených fázích. Stacionární fáze pro HILIC jsou také méně odolné vůči rychlému gradientu a krátkým ekvilibračním časům ve srovnání s obrácenými fázemi. Nedostatečná ekvilibrace kolon pro HILIC bude vést k posunům retenčních časů a ke špatné reprodukovatelnosti. Je také jasné, že gradient nesmí běžet od 100% organického ke 100% vodnému podílu v mobilní fázi kvůli nezbytnosti malého podílu vody v eluentu [15].

Dávkované objemy vzorku se běžně pohybují mezi 1 - 100 μ l. Nástřik nadměrných objemů vzorku bude způsobovat objemové přetížení, které se projeví sníženou separační účinností. Aby byla zachována maximální separační účinnost, dávkovaný objem by neměl překročit 1% celkového objemu kolony. Při přípravě vzorku pro HILIC separace vzorky nemají být rozpuštěny v příliš hydrofilním rozpouštědle. V opačném případě by bylo rozdělování analytu do stacionární fáze sníženo, což by v konečném důsledku vedlo k nižší retenci a horší separační účinnosti. Vzorky by měly být rozpuštěny v organickém rozpouštědle nebo mobilní fázi. Obsah

vody by měl být snížen na minimum. Jako rozpouštědlo pro vzorek je upřednostňovaný acetonitril.

Kolony pro HILIC obsahují hydrofilní stacionární fázi, často nesoucí náboj, alespoň v určitém rozmezí pH. Sloučeniny separované na koloně interagují se stacionární fází a obecně platí, že hydrofilnější sloučenina bude také více zadržována. Pokud chceme docílit většího zadržení analytu v chromatografickém systému, zajistíme to vyšší koncentrací organického rozpouštědla v mobilní fázi. Narozdíl od většiny jiných chromatografických technik je část mobilní fáze zabudovanou součástí stacionární fáze, a proto je rozhodující udržovat koncentraci vody v eluentu na určité hranici, obvykle mezi 3 – 60%. 3% vody jsou spodní hranicí pro její obsah v mobilní fázi, aby vůbec byla zajištěna dostatečná hydratace částic stacionární fáze. Většina kolon vhodných pro HILIC je na silikagelovém podkladě, a proto netoleruje vysoké pH prostředí. Vhodné rozmezí pH pro silikagelové kolony bývá 3 – 8, kdežto pro polymerní kolony dokonce 2 – 10 [15].

Příklady stacionárních fází použitelných pro separace HILIC:

- nemodifikovaný silikagel – je používán ve značném počtu prací věnovaných HILIC k separacím řady velmi polárních přírodních sloučenin i syntetických léčiv; narozdíl od chromatografie na normálních fázích je HILIC mód účinný i pro bioanalytické separace; protože neobsahuje žádné synteticky navázané funkční skupiny, které by mohly vykazovat falešné signály v hmotnostním spektru, lze bez problémů použít ve spojení chromatografie s hmotnostní spektrometrií [14]
- silikagel s aminopropylovými funkčními skupinami – byl jako první z modifikovaných silikagelových stacionárních fází rutinně používán v módu HILIC; charakteristické uplatnění nachází právě v HILIC a navíc ještě v chromatografii na normálních fázích; nevýhodou je omezená stabilita ve vodných eluentech, tedy za podmínek HILIC
- nesilikagelové fáze s aminovými funkčními skupinami – mají obecně lepší stabilitu ve srovnání s předchozím typem stacionární fáze; dají se použít v kyselém i zásaditém prostředí
- silikagel s amidovými funkčními skupinami
- silikagel s diolovými funkčními skupinami – celkovou polaritou se dost přibližuje nemodifikovanému silikagelu; patří mezi nejstarší modifikované

silikagelové fáze, které byly vyvinuty, přesto byl úspěšně použit zatím jen v několika málo vědeckých pracích

- cyklodextrinové fáze – jsou to modifikované silikagelové fáze s navázanými cyklickými oligosacharidy, složenými z pěti a více glukopyranozidových jednotek; protože jsou dutiny navázaných cyklických oligosacharidů tvořeny z opticky aktivních cukrů, jsou cyklodextrinové fáze žádané pro uskutečnění chirálních separací v módu HILIC
- silikagel s kyanopropylovými funkčními skupinami – aplikace tohoto druhu stacionárních fází v módu HILIC je jen řídká; kvůli neschopnosti tvořit jako donor vodíkové můstky se nehodí pro chromatografii na normálních fázích, tudíž ani příliš pro HILIC, naopak je bohatě využíván v chromatografii na obrácených fázích; nevýhodou je také nízká mechanická stabilita při práci s rozpouštědly střední polarit
- sulfonovaný styren-kopoly-divinylbenzen – dá se použít pro HILIC separace, jestliže je stupeň sulfonace dostatečně vysoký
- silikagel se sulfoalkylbetainovými funkčními skupinami – současný výskyt kvarterní ammoniové a sulfonové skupiny zajišťuje nulový náboj; pro HILIC je výhodná schopnost zwitteriontového prostředí vázat vodu, navíc nízký povrchový náboj nepodporuje iontovýměnné interakce [14]

Metoda HILIC se používala zejména pro analýzu oligosacharidů, z dalších látek to byly například glykopeptidy a saponiny. V současné době nachází uplatnění i v analýze cytostatik a antibiotik, toxinů, syntetických polymerů, metabolitů, aminokyselin, peptidů a proteinů [14].

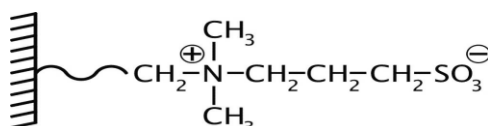
3.4. Analytické kolony použité v této práci

3.4.1. Analytická kolona ZIC – HILIC

Zjednodušeně lze říct, že co platí pro metodu HILIC obecně, platí i pro zacházení s kolonami ZIC – HILIC, což je patrné již z názvu kolon.

ZIC – HILIC fáze je tvořena vysoce polárními sulfobetainovými funkčními skupinami, které jsou kovalentně navázané na částice porézního silikagelu. Jedná se o

moderní zwitteriontový materiál vyrobený patentovanou technologií. Vyniká jedinečnou selektivitou. Separace je dosaženo rozdělováním analytu na zwitteriontové stacionární fázi. Tento druh interakcí je umožněn užitím eluentů s vysokým obsahem organického rozpouštědla. Zmiňovaná stacionární fáze také dovoluje tvorbu slabých elektrostatických interakcí, zesilujících dále selektivitu. ZIC – HILIC stacionární fáze jsou k dostání v kapilárním provedení i v rozměrnějším provedení určeném pro preparativní účely [16, 17].



Obr. 3.: Znárodnění stacionární fáze kolony ZIC – HILIC

Typické mobilní fáze používané ve spojení s kolonami ZIC – HILIC jsou podobné jako při chromatografii na obrácených fázích. Vodná část eluentu je v mobilní fázi silně eluující složkou. Nízký tlak při metodě HILIC (daný vysokým obsahem acetonitrilu v mobilní fázi, který má nižší viskozitu oproti jiným eluentům pro chromatografii na obrácených fázích) dovoluje užít vyšší průtokové rychlosti mobilní fáze [17, 18].

Kolony ZIC – HILIC se hodí pro analyty, které jsou nedostatečně zadržovány na kolonách pro chromatografii na obrácených fázích (jedná se především o polární a hydrofilní sloučeniny). ZIC – HILIC kolona může být použita jako prostředek ke změně selektivity nebo ke zlepšení výsledného tvaru píku polárních a hydrofilních sloučenin. Selektivita ZIC – HILIC kolon je vhodná pro analýzu peptidů, proteinů, aminokyselin, rostlinných extraktů, metabolitů, kyselin a bází, organických a anorganických iontů, komplexů kovů [16, 17, 18].

ZIC – HILIC kolona může pracovat při pH 3 – 8. Kolona by neměla být promývána hydroxidem sodným, ani by neměla přijít do kontaktu se silně alkalickými roztoky. Při analýzách může být kolona zahřáta až na 70°C. Kolona se uchovává naplněná 80% acetonitrilem v octanu amonném (5 mM, pH 6,8) [18].

3.4.2. Analytická kolona SUPELCOSIL LC – SCX

Jedná se o katexovou kolonu. Svě uplatnění tudíž nachází především při analýze látek bazické povahy. Stacionární fáze je tvořena silně kyselými skupinami propylsulfonové kyseliny, které jsou navázány na sférických částicích silikagelu. Výhodou je, že kolonu lze použít při jakémkoliv pH, neboť silný katex zůstává ionizován v celém rozmezí pH. Zlepšení retence a selektivity se dá dosáhnout vhodným nastavením pH, iontové síly a koncentrace organického rozpouštědla. Kolona používaná pro naše experimenty má délku 25 cm, vnitřní průměr 4,6 mm a velikost částic náplně 5 μm . Velikost povrchu náplně je 170 m^2/g [19].

3.4.3. Analytická kolona Discovery Zr – PBD

Inertním nosičem v této koloně je oxid zirkoničitý narozdíl od výše zmíněných kolon.

Silikagelové, polymerní stacionární fáze a fáze na bázi oxidu hlinitého, které se dnes hojně užívají, mívají špatnou účinnost při určitých pracovních podmínkách, jako je vysoké pH mobilní fáze a zvýšená teplota při analýze. Naproti tomu oxid zirkoničitý je chemicky stabilní v celém rozmezí pH a teplotně stabilní i při teplotách do 200°C, což představuje určitou výhodu, neboť separace prováděné za vyšších teplot jsou rychlejší a je při nich menší spotřeba organického rozpouštědla. Má také vysokou mechanickou odolnost. Tato extrémní stabilita umožňuje promývat dané kolony za drsnějších podmínek (kyselé nebo bazické čisticí roztoky), což zase na druhou stranu prodlužuje životnost kolony, kolona se tak rychle nezanášá nečistotami. Dlouhá životnost a stabilita vedou k nižším nákladům připadajícím na jednu analýzu a k větší variabilitě podmínek, za kterých jsou separace prováděny [20, 21].

Podle funkčních skupin navázaných na částicích oxidu zirkoničitého se dají kolony tohoto typu použít pro chromatografii na normálních fázích, pro chromatografii na obrácených fázích i pro iontově – výměnnou chromatografii. Kolony na bázi oxidu zirkoničitého se dají aplikovat na analýzu řady sloučenin včetně aminokyselin, proteinů, nukleových kyselin, uhlovodíků, vzorků z životního prostředí, klinických vzorků a léčiv. Tyto kolony mají umožňovat rychlejší a selektivnější separace za současné úspory nákladů na jednu analýzu [20, 21].

Kolona Discovery Zr – PBD je naplněna sférickými částicemi oxidu zirkoničitého, na které jsou pevně navázány fragmenty polybutadienu. Kolona pracuje v módu chromatografie na obrácených fázích, dává podobné výsledky jako silikagelové kolony modifikované oktadecylovými skupinami, avšak oproti nim má daleko větší stabilitu. Je stabilní při pH od 1 do 13 a teplotně stabilní při teplotách do 100°C. Kolona se hodí pro analýzu bazí, především aminů. To souvisí s tím, že při vyšším pH mobilní fáze a při zvýšené teplotě mají bazické analyty lepší tvar píku a jsou účinněji separovány [22].

3.4.4. Analytická kolona Discovery Zr – CarbonC18

Náplň tvoří uhlíkem pokrytý oxid zirkoničitý, na který jsou kovalentně vázány oktadecylové skupiny. Kolona je použitelná v rozmezí pH 1 – 14 a odolává teplotám do 100°C. Má téměř univerzální použití, protože většina organických sloučenin je dostatečně hydrofobních, aby mohly reagovat do určitého stupně s oktadecylovými řetězci. Její selektivita je však naprosto odlišná od oktadecylových kolon se silikagelovým nosičem. Je určena pro separace kyselých, bazických i neutrálních sloučenin na obrácených fázích [22, 23].

Jednou z výhod přítomnosti částic elementárního uhlíku ve stacionární fázi je jeho schopnost rozlišovat mezi jednotlivými tvary molekul. Zatímco silikagel modifikovaný oktadecylovými skupinami nedovoluje rozlišení prostorových izomerů, u této stacionární fáze je tomu naopak. Důvod spočívá v tom, že oktadecylové řetězce se mohou přizpůsobovat tvaru analyzovaných molekul, kdežto rigidní uhlík zastoupený ve zmiňované fázi nikoliv. Na modifikovaném silikagelu tak dochází k separacím pouze na základě celkové hydrofobicity, kterou mají prostorové izomery stejnou. Při separacích na fázi Zr – CarbonC18 se navíc uplatňuje i tvarová selektivita stacionární fáze.

Na této koloně byla ze skupiny léčiv provedena například analýza nesteroidních antiflogistik, beta – blokátorů, sulfonamidového léčiva a jeho prostorových izomerů [22].

3.5. Validace analytické metody

Validace analytické metody je proces, při kterém se zjišťují nejdůležitější charakteristiky metody. Smyslem validace je ověřit, zda je vypracovaná metoda vhodná

pro daný účel použití. Cílem validace je určit podmínky, za kterých je zkušební postup použitelný, a zajistit stejnou spolehlivost při opakovaném použití v jedné, nebo i v různých laboratořích [24].

3.5.1. Test způsobilosti systému

Test způsobilosti analytického systému je nedílnou součástí validace analytické metody a slouží k zajištění přiměřené spolehlivosti systému. Při každém novém použití metody se neopakuje celá validace, ale jsou definována určitá kritéria, která musí být splněna a která se obecně nazývají test způsobilosti analytického systému. Při splnění požadavků testu způsobilosti se předpokládá, že dříve provedená validace platí [24].

Účinnost chromatografické kolony

Účinnost chromatografické kolony vyjádřená počtem teoretických pater N se dá vypočítat podle vzorce:

$$N = 5,54 \cdot (t_R / w_h)^2$$

t_R = retenční čas

w_h = šířka píku v polovině jeho výšky

Z počtu teoretických pater N lze vypočítat ještě výškový ekvivalent teoretického patra H , jestliže je známa celková délka kolony L :

$$H = L / N$$

Výškový ekvivalent teoretického patra má rozměr délky (většinou v μm). Na základě tohoto parametru

je možné porovnávat účinnost chromatografických kolon o různých délkách [25].

Asymetrie chromatografických píků

Tato veličina vyjadřuje symetrii chromatografického píku. Asymetrie chromatografických píků A_S se dá vypočítat podle vzorce:

$$A_S = W_{0,05} / 2d$$

$W_{0,05}$ = šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky

d = menší část úsečky, která vznikne protnutím úsečky $W_{0,01}$ kolmicí spuštěnou z vrcholu píku [25]

Rozlišení chromatografických píků

Rozlišení chromatografických píků je veličina zajišťující, že látky eluující se blízko sebe jsou od sebe odděleny. Rozlišení se dá vypočíst podle vzorce:

$$R_S = 1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1}) / (W_{h1} + W_{h2})$$

t_R = retenční čas látek

W_h = šířka píku v poloviční výšce [25]

Opakovatelnost

Opakovatelnost je ověření spolehlivosti metody prováděné za stejných podmínek během krátkého časového intervalu ve stejné laboratoři stejným pracovníkem. Provádí se ověření opakovatelnosti plochy píku a ověření opakovatelnosti pro retenční čas. Opakovatelnost se vyjadřuje pomocí relativní směrodatné odchylky [24].

3.5.2. Vlastní validace analytické metody

Správnost

Tento test vyjadřuje shodu mezi získaným výsledkem a správnou hodnotou. Touto správnou (referenční) hodnotou může být skutečný známý obsah látky nebo obsah zjištěný jinou nezávislou metodou s ověřenou správností. Správnost se obvykle vyjadřuje jako výtěžnost R, která se vypočítá podle vzorce:

$$R (\%) = 100 \cdot c_i / c_0$$

c_i = koncentrace stanovená u testovaného vzorku

c_0 = známá správná koncentrace [24]

Přesnost

Přesnost je míra shody mezi jednotlivými výsledky metody, opakovaně získanými s jedním homogenním vzorkem. Podle podmínek opakování se rozlišují tři úrovně přesnosti – opakovatelnost, mezilehlá přesnost a reprodukovatelnost. Přesnost se vyjadřuje pomocí relativní směrodatné odchylky [24].

Selektivita

Selektivita je schopnost analytické metody stanovit správně a specificky danou látku v přítomnosti jiných látek, jež lze očekávat. To mohou být nečistoty, rozkladné produkty, v případě léčiv pomocné látky nebo další účinné látky [24].

Detekční limit

Detekční limit vyjadřuje citlivost metody. Je to nejnižší detekovatelná koncentrace látky, nestanovované kvantitativně, za definovaných experimentálních podmínek. U instrumentálních metod se může určit jako koncentrace analyzované látky s poměrem signálu k šumu s hodnotou 3. Detekční limit se ověřuje analýzou příslušné koncentrace vzorku [24].

Kvantitativní limit

Kvantitativní limit je také parametrem citlivosti metody. Je to nejnižší koncentrace látky stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Kvantitativní limit je často vyjadřován jako koncentrace stanovované látky s poměrem signálu k šumu s hodnotou 10 [24].

Linearita

Linearita znamená schopnost metody poskytovat v definovaném intervalu výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky. Tento test hodnotí kvalitu závislosti plochy píku na koncentraci analyzované látky. Obvykle se stanovuje minimálně pět různých koncentrací v rozmezí 50 – 150% očekávané koncentrace. Je možné přitom pracovat s roztoky standardů, protože rušivé vlivy u reálných vzorků jsou hodnoceny jinými parametry validace [24].

Rozsah

Tento parametr se obvykle odvozuje z linearity metody a rozumí se jím koncentrační rozmezí, ve kterém může být metoda používána. V tomto koncentračním rozmezí musí být splněny požadavky na správnost a přesnost metody [24].

Robustnost

Robustnost vyjadřuje míru vlivu proměnných podmínek na výsledky analýzy. Analytická metoda je robustní, jestliže přesnost stanovení není ovlivněna malými změnami pracovních podmínek. K tomuto testu se připraví roztok standardu analyzované látky, nastříkne se do chromatografického systému a změří se odpovídající plocha píku. Před každým nástřikem se změní pracovní podmínky. Cílem je upozornit na podmínky, které mohou ovlivnit výsledky. U metody využívající vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii se sledují například vlivy jako složení mobilní fáze, pH

vodné složky mobilní fáze, teplota na koloně, rychlost průtoku, stabilita analyzovaných vzorků [24].

3.6. Přehled publikovaných metod pro stanovení pteridinů a kreatininu

3.6.1. Stanovení pteridinů a kreatininu metodou HPLC

Tab. 1.: Přehled HPLC technik použitých k analýzám pteridinů a kreatininu

Látka	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Průtoková rychlost (ml/min)	Detekce	Citace
biopterin, neopterin	C ₁₈ μ - Bondapak (300 x 9,0 mm)	10 mM fosfátový pufr pH 3,2 : methanol (96 : 4)	1,0	fluorescenční λ _{exc} = 335 λ _{emis} = 440 nm	[26]
biopterin, neopterin	Develosil ODS – K – 5 (150 x 4,6 mm; 5 μm)	50 mM fosfátový pufr pH 3,0	1,0	fluorescenční λ _{exc} = 355 λ _{emis} = 450 nm	[27]
neopterin	Spherisorb (250 x 4,6 mm; 5 μm)	voda : acetonitril (99 : 1)	1,5	fluorescenční λ _{exc} = 353 λ _{emis} = 438 nm	[28]
neopterin, kreatinin	LiChroCART (250 x 4,0 mm; 7 μm)	15 mM fosfátový pufr pH 6,0	0,8	neopterin: fluorescenční λ _{exc} = 353 λ _{emis} = 438 nm; kreatinin: UV λ = 235 nm	[29]
neopterin	Separon SGX (150 x 3,3 mm; 5 μm)	15 mM fosfátový pufr pH 6,4	0,8	fluorescenční λ _{exc} = 353 λ _{emis} = 438 nm	[30]
biopterin	Synergi Hydro RP C18 (250 x 4,6 mm; 4 μm)	0,1% vodná kyselina trifluoroctová : acetonitril (97 : 3)	-	fluorescenční λ _{exc} = 350 λ _{emis} = 440 nm	[31]
biopterin	Hypersil C ₁₈ (200 x 2,1 mm; 5 μm)	15 mM fosfátový pufr pH 6,45 : methanol (gradientová eluce)	0,4	fluorescenční λ _{exc} = 360 λ _{emis} = 440 nm	[32]
kreatinin	Nova – Pak C ₁₈ (150 x 3,9 mm)	20 mM fosfátový pufr pH 6,5	-	UV λ = 220 nm	[33]

Tab. 2.: Přehled HPLC technik použitých k analýzám pteridinů a kreatininu – pokračování

Látka	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Průtoková rychlost (ml/min)	Detekce	Citace
neopterin	Nucleosil C ₁₈ (150 x 4,6 mm; 3 μm)	15 mM fosfátový pufr pH 6,4	0,8	fluorescenční λ _{exc} = 353 λ _{emis} = 438 nm	[34]
kreatinin	Phenomenex C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 μm)	10 mM fosfátový pufr pH 4,7	1,0	UV λ = 220 nm	[35]
kreatinin	Betabasic (250 x 4,6 mm)	45 mM síran amonný	0,75	UV λ = 205 nm	[36]
kreatinin	Supelcosil LC – 18 (250 x 4,6 mm; 5 μm)	50 mM fosfátový pufr pH 7,4	-	UV λ = 235 nm	[37]
kreatinin	ODS – 80TM (150 x 4,6 mm; 5 μm)	acetonitril : voda (15 : 85)	0,7	DAD	[38]
biopterin, neopterin, kreatinin	Nova – Pack (150 x 3,9 mm; 5 μm)	Tris – NaCl pufr pH 6,8	1,0	pteridiny: fluorescenční λ _{exc} = 280 λ _{emis} = 444 nm; kreatinin: UV λ = 230 nm	[39]
dihydroneopterin, neopterin	LiChroCART RP 18 (125 mm; 5 μm)	15 mM H ₃ PO ₄ /KH ₂ PO ₄ pH 3,9 : acetonitril (97 : 3)	1,0	fluorescenční λ _{exc} = 353 λ _{emis} = 438 nm;	[40]
neopterin	Phenomenex Develosil ODS – MG – 5 (250 x 4,2 mm)	20 mM fosfátový pufr pH 6,0 : methanol (95 : 5)	1,0	fluorescenční λ _{exc} = 353 λ _{emis} = 438 nm	[41]
tetrahydrobiopterin	Wakosil 5C18N (250 x 4,6 mm)	methanol : voda (3 : 97)	0,8	fluorescenční λ _{exc} = 350 λ _{emis} = 450 nm	[42]

3.6.2. Stanovení pteridinů a kreatininu jinými metodami

Tab. 3.: Přehled ostatních analytických metod použitých k analýzám pteridinů a kreatininu

Látka	Analytická metoda	Detekce	Citace
biopterin	tenkovrstvá chromatografie	UV $\lambda = 254$ a 360 nm	[43]
kreatinin	kapilární elektroforéza	vodivostní	[44]
kreatinin	průtoková injekční analýza	VIS $\lambda = 500$ nm	[45]
kreatinin	plynová chromatografie	hmotnostní	[46]
kreatinin	micelární elektrokinetická chromatografie	UV $\lambda = 235$ nm	[47]

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Přístrojové vybavení

Kapalinový chromatograf: SHIMADZU LC – 10, SHIMADZU, Japonsko

Vyhodnocení: software LC Solution for Windows

Kolony: ZIC – HILIC 125 x 2,1 mm, 3,5 µm, SEQUANT, Švédsko

SUPELCOSIL LC – SCX 250 x 3 mm, 5 µm, SIGMA – ALDRICH, Praha,
Česká republika

Discovery Zr – PBD 150 x 4,6 mm, 5 µm, SIGMA – ALDRICH, Praha, Česká
republika

Discovery Zr – CarbonC18 75 x 4,6 mm, 3 µm, SIGMA – ALDRICH, Praha,
Česká republika

Laboratorní pH metr: Hanna, FISCHER SCIENTIFIC, Česká republika

Analytické váhy: Sartorius 2004 MP, SARTORIUS, Německo

Automatické pipety: Biohit, FISCHER SCIENTIFIC, Česká republika

4.2. Chemikálie

Biopterin, 98%, SIGMA – ALDRICH, Praha, Česká republika

Kreatinin, 99%, SIGMA – ALDRICH, Praha, Česká republika

7,8 – dihydroneopterin, 97%, SIGMA – ALDRICH, Praha, Česká republika

5,6,7,8 – tetrahydroneopterin, poskytnuto Fakultní nemocnicí Hradec Králové

Neopterin, 98,5%, SIGMA – ALDRICH, Praha, Česká republika

Jodid draselný, CHEMAPOL, Praha, Česká republika

Acetonitril R CHROMASOLV for HPLC, gradient grade, SIGMA – ALDRICH,
Praha, Česká republika

Methanol R CHROMASOLV for HPLC, SIGMA – ALDRICH, Praha, Česká
republika

Kyselina octová koncentrovaná, 99%, FLUKA, SIGMA – ALDRICH, Praha, Česká
republika

Octan amonný, p.a., BALEX, Pardubice, Česká republika

Hydroxid amonný, 25%, SIGMA – ALDRICH, Praha, Česká republika

Triethylammonium – hydroxid, SIGMA – ALDRICH, Praha, Česká republika

Kyselina fosforečná 85%, p.a., MERCK, Německo

Fosforečnan trisodný, p.a., dodekahydrát, BALEX, Pardubice, Česká republika

Ultračistá voda pro HPLC

Vzorky moči byly dodány z Fakultní nemocnice Hradec Králové.

4.3. Příprava roztoků

4.3.1. Příprava roztoků pro analýzu

Tab. 4.: Složení roztoků pro analýzu

Množství látky	Rozpouštědlo	Objem roztoku	Výsledná koncentrace roztoku
5 mg KRE (kreatininu)	voda : methanol 50 : 50	50 ml	0,1 mg/ml
5 mg NEO (neopterinu)	voda : methanol 50 : 50	50 ml	0,1 mg/ml
0,5 ml roztoku NEO 10 mg/100ml	voda : methanol 50 : 50	50 ml	0,001 mg/ml
20 mg KRE	voda : methanol 50 : 50	100 ml	0,2 mg/ml
1 mg BIO (biopterinu)	voda : methanol 50 : 50	100 ml	0,01 mg/ml
1 mg DHN (dihydroneopterinu)	voda : methanol 50 : 50	100 ml	0,01 mg/ml
1 mg THN (tetrahydroneopterinu)	voda : methanol 50 : 50	100 ml	0,01 mg/ml
1 mg NEO	voda : methanol 50 : 50	100 ml	0,01 mg/ml
100 µl roztoku BIO 1 mg/100ml	ACN (acetonitril)	1000 µl	0,001 mg/ml
100 µl roztoku DHN 1 mg/100ml	ACN	1000 µl	0,001 mg/ml
100 µl roztoku THN 1 mg/100ml	ACN	1000 µl	0,001 mg/ml
100 µl roztoku NEO 1 mg/100ml	ACN	1000 µl	0,001 mg/ml
100 µl BIO, 100 µl DHN, 100 µl THN, 100 µl NEO o koncentracích 0,1 mg/100ml	ACN	1000 µl	-
100 µl BIO, 100 µl DHN, 100 µl THN, 100 µl NEO o koncentracích 0,1 mg/100ml, 600 µl roztoku KRE 20 mg/100ml	-	1000 µl	-

100 µl předchozího roztoku	ACN	1000 µl	koncentrace jednotlivých pteridinů 400 nmol/l
2 mg BIO	voda : methanol 50 : 50	100 ml	0,02 mg/ml
2 mg DHN	voda : methanol 50 : 50	100 ml	0,02 mg/ml
2 mg THN	voda : methanol 50 : 50	100 ml	0,02 mg/ml
2 mg NEO	voda : methanol 50 : 50	100 ml	0,02 mg/ml
1 mg KRE	voda : methanol 50 : 50	100 ml	0,01 mg/ml
1 ml BIO, 1 ml DHN, 1 ml THN, 1 ml NEO o koncentracích 2 mg/100ml, 10 ml roztoku KRE 1 mg/100ml	ACN : 0,5% kys. octová 87 : 13	100 ml	1000 nmol/l pteridinů, 10 µmol/l KRE
50 ml předchozího roztoku	ACN : 0,5% kys. octová 87 : 13	100 ml	500 nmol/l pteridinů, 5 µmol/l KRE
10 ml roztoku pteridinů o koncentraci 1000 nmol/l a KRE o koncentraci 10 µmol/l	ACN : 0,5% kys. octová 87 : 13	100 ml	100 nmol/l pteridinů, 1 µmol/l KRE
10 ml roztoku pteridinů o koncentraci 500 nmol/l a KRE o koncentraci 5 µmol/l	ACN : 0,5% kys. octová 87 : 13	100 ml	50 nmol/l pteridinů, 0,5 µmol/l KRE
10 ml roztoku pteridinů o koncentraci 100 nmol/l a KRE o koncentraci 1 µmol/l	ACN : 0,5% kys. octová 87 : 13	100 ml	10 nmol/l pteridinů, 0,1 µmol/l KRE
10 µl moči odstředěné ve Fakultní nemocnici Hradec Králové	ACN : 0,5% kys. octová 87 : 13	1000 µl	-

- Roztok jodidu draselného v acetonitrilu byl připraven rozpuštěním několika krystalků jodidu draselného v acetonitrilu přímo ve vialce.

4.3.2. Příprava vodných složek mobilní fáze

- 0,5% roztok kyseliny octové byl připraven smícháním 1 ml koncentrované kyseliny octové s vodou a doplněním v odměrné baňce do 200 ml. pH metrem byla zjištěna hodnota pH 2,89.

- 0,1% roztok kyseliny octové byl připraven napipetováním 200 μ l koncentrované kyseliny octové do vody a doplněním v odměrné baňce do 200 ml. pH metrem byla zjištěna hodnota pH 3,21.
- Roztok octanu amonného o koncentraci 100 mmol/l a pH = 6,8 byl připraven navážením 1,5416 g octanu amonného a jeho rozpuštěním ve 150 ml vody. pH metrem byla zkontrolována hodnota pH, případně byla provedena titrace zředěným roztokem hydroxidu amonného, nebo zředěnou kyselinou octovou k úpravě pH na hodnotu 6,8. Pak byl roztok převeden do odměrné baňky a doplněn vodou do 200 ml.
- Roztok octanu amonného o koncentraci 50 mmol/l a pH = 6,8 byl připraven navážením 0,7708 g octanu amonného a jeho rozpuštěním ve 200 ml vody. pH metrem pak byla zkontrolována hodnota pH.
- Roztok octanu amonného o koncentraci 10 mmol/l a pH = 6,8 byl připraven navážením 0,1542 g octanu amonného a jeho rozpuštěním ve 200 ml vody. pH metrem pak byla zkontrolována hodnota pH.
- Roztok octanu amonného o koncentraci 50 mmol/l a pH = 3,8 byl připraven přidáním 570 μ l koncentrované kyseliny octové do kádinky se 150 ml vody. pH metrem byla u této směsi zjištěna hodnota pH 2,82. Směs byla dále titrována zředěným roztokem hydroxidu amonného až do dosažení hodnoty pH 3,8. Pak byl roztok převeden do odměrné baňky a doplněn vodou do 200 ml.
- Roztok octanu amonného o koncentraci 50 mmol/l a pH = 4,8 byl připraven přidáním 570 μ l koncentrované kyseliny octové do kádinky se 150 ml vody. pH metrem byla u této směsi zjištěna hodnota pH 2,82. Směs byla dále titrována zředěným roztokem hydroxidu amonného až do dosažení hodnoty pH 4,8. Pak byl roztok převeden do odměrné baňky a doplněn vodou do 200 ml.
- Roztok octanu amonného o koncentraci 50 mmol/l a pH = 5,8 byl připraven přidáním 570 μ l koncentrované kyseliny octové do kádinky se 150 ml vody. pH metrem byla u této směsi zjištěna hodnota pH 2,82. Směs byla dále titrována zředěným roztokem hydroxidu amonného až do dosažení hodnoty pH 5,8. Pak byl roztok převeden do odměrné baňky a doplněn vodou do 200 ml.
- Roztok octanu amonného o koncentraci 50 mmol/l a pH = 7,8 byl připraven rozpuštěním 0,7708 g octanu amonného ve 150 ml vody. pH metrem byla u této směsi zjištěna hodnota pH 6,81. Směs byla dále titrována zředěným roztokem

hydroxidu amonného až do dosažení hodnoty pH 7,8. Pak byl roztok převeden do odměrné baňky a doplněn vodou do 200 ml.

- Roztok triethylammonium – hydroxidu o koncentraci 50 mmol/l byl připraven odebráním 2,525 ml triethylammnium – hydroxidu a doplněním do 500 ml v odměrné baňce vodou. pH metrem byla zjištěna výsledná hodnota pH 11,62.
- 0,85% zásobní roztok kyseliny fosforečné byl připraven pipetováním 1 ml koncentrované kyseliny fosforečné 85 % do vody a doplněním v odměrné baňce do 100 ml.
- 0,085% roztok kyseliny fosforečné byl připraven 10 násobným zředěním 0,85% zásobního roztoku kyseliny fosforečné vodou. pH metrem byla zjištěna výsledná hodnota pH 2,18.
- 0,0085% roztok kyseliny fosforečné byl připraven 100 násobným zředěním 0,85% zásobního roztoku kyseliny fosforečné vodou. pH metrem byla zjištěna výsledná hodnota pH 2,90.
- 0,017% roztok kyseliny fosforečné byl připraven 5 násobným zředěním 0,085% roztoku kyseliny fosforečné vodou. pH metrem byla zjištěna výsledná hodnota pH 2,72.
- Roztok fosforečnanu sodného o koncentraci 25 mmol/l byl připraven navážením 4,7515 g fosforečnanu sodného dodekahydrátu, jeho rozpuštěním ve vodě a doplněním v odměrné baňce do 500 ml. pH metrem byla zjištěna výsledná hodnota pH 12,91.

Vodné složky mobilní fáze musely být před použitím zfiltrovány. Při každé výměně mobilní fáze, výměně kolony nebo změně poměru dosavadní mobilní fáze musela být kolona ponechána ekvilibrovat se určitou dobu do ustálení podmínek. Zejména u metody HILIC je dostatečná doba ekvilibrace značně důležitá.

Pro míchání mobilní fáze bylo využito binární čerpadlo, které čerpalo zároveň organickou složku mobilní fáze a složku vodnou, vždy v daném poměru jednotlivých složek, čímž byla zajištěna opakovatelnost přesného míchání.

4.4. Vývoj metody – optimalizace chromatografických podmínek

Na základě výsledků rešerše byla pro kreatinin zvolena UV detekce při vlnové délce 235 nm a pro pteridiny, to znamená biopterin, dihydroneopterin, tetrahydroneopterin a neopterin, byla zvolena fluorescenční detekce s excitační vlnovou délkou 353 nm a emisní vlnovou délkou 438 nm. Tento způsob detekce je shodný pro všechny prováděné analýzy. Bylo nutné najít vhodné chromatografické podmínky. Těmito podmínkami bylo v první řadě složení mobilní fáze a výběr analytické kolony. Byly vyzkoušeny různé analytické kolony. U každé z nich bylo testováno několik mobilních fází, složených vždy z vodné a organické složky, jejichž poměry se také měnily. Byly zkoušeny i různé průtokové rychlosti mobilní fáze, teploty analýzy a nastříkované objemy vzorků. Poslední zmiňované se měnily v závislosti na druhu vzorku.

4.4.1. Schéma práce v experimentální části

Počátečním cílem bylo vyhodnotit retenci polárních látek neopterinu a kreatininu za použití metody HILIC a při jejich dobré retenci zkusit separaci ve směsi se zbylými zkoumanými standardy.

Na kolonu ZIC – HILIC 125 x 2,1 mm, 3,5 μm , byl nastříkován roztok jodidu draselného v acetonitrilu, roztok kreatininu o koncentraci 0,1 mg/ml a roztok neopterinu o koncentraci 0,001 mg/ml.

Parametry shodné pro všechna měření uvedená v Tab. 5. jsou následující:

Bylo vždy dávkováno 5 – 10 μl roztoku v závislosti na odezvě detektoru.

Průtoková rychlost: 0,25 ml/min

Teplota: 25°C

Tab. 5.: Složení mobilní fáze při analýze kreatininu a neopterinu na koloně ZIC – HILIC

(AcAc = kyselina octová; AmAc = octan amonný)

ACN : voda	ACN : 0,5% AcAc	ACN : 0,1% AcAc	ACN : 100mM AmAc pH 6,8	ACN : 50mM AmAc pH 6,8	ACN : 10mM AmAc pH 6,8	ACN : 50mM AmAc pH 3,8	ACN : 50mM AmAc pH 4,8	ACN : 50mM AmAc pH 5,8	ACN : 50mM AmAc pH 7,8
-	40 : 60	40 : 60	40 : 60	40 : 60	40 : 60	40 : 60	40 : 60	40 : 60	40 : 60
50 : 50	50 : 50	50 : 50	50 : 50	50 : 50	50 : 50	50 : 50	50 : 50	50 : 50	50 : 50
60 : 40	60 : 40	60 : 40	60 : 40	60 : 40	60 : 40	60 : 40	60 : 40	60 : 40	60 : 40
70 : 30	70 : 30	70 : 30	70 : 30	70 : 30	70 : 30	70 : 30	70 : 30	70 : 30	70 : 30
80 : 20	80 : 20	80 : 20	80 : 20	80 : 20	80 : 20	80 : 20	80 : 20	80 : 20	80 : 20
85 : 15	85 : 15	85 : 15	85 : 15	85 : 15	85 : 15	85 : 15	85 : 15	85 : 15	85 : 15
90 : 10	90 : 10	-	90 : 10	90 : 10	90 : 10	90 : 10	90 : 10	90 : 10	90 : 10
-	-	-	95 : 5	95 : 5	95 : 5	95 : 5	95 : 5	95 : 5	95 : 5

Následně bylo vybráno několik chromatografických podmínek výhodných z hlediska retence a tvaru píků a na kolonu ZIC – HILIC 125 x 2,1 mm, 3,5 μm, byl nastříkovan roztok směsi všech standardů, eventuálně roztok směsi standardů kromě kreatininu v případě, že analýza kreatininu trvala příliš dlouhou dobu. Jednotlivé pracovní roztoky biopterinu, dihydroneopterinu, tetrahydroneopterinu a neopterinu byly nastříkovány tehdy, když bylo nutné identifikovat píky při analýze směsi.

Parametry shodné pro všechna měření uvedená v Tab. 6. jsou následující:

Bylo vždy dávkováno 5 – 10 μl roztoku v závislosti na odezvě detektoru.

Průtoková rychlost: 0,25 ml/min

Teplota: 25°C

Tab. 6.: Složení mobilní fáze při analýze směsi standardů na koloně ZIC – HILIC

ACN : 0,5%AcAc	ACN : 50 mM AmAc pH 3,8	ACN : 50 mM AmAc pH 4,8	ACN : 50 mM AmAc pH 7,8
70 : 30	-	-	-
80 : 20	80 : 20	80 : 20	80 : 20
85 : 15	85 : 15	85 : 15	85 : 15
87 : 13	-	-	-
88 : 12	-	-	-
-	90 : 10	90 : 10	90 : 10

Následně byla zkoušena separace směsi standardů i na jiných chromatografických kolonách určených pro HPLC.

Na kolonu SUPELCOSIL LC – SCX 250 x 3 mm, 5 µm, byl nastříkovan roztok směsi všech standardů. Jednotlivé roztoky biopterinu, dihydroneopterinu, tetrahydroneopterinu a neopterinu byly nastříkovány tehdy, když bylo nutné identifikovat píky při analýze směsi.

Parametry shodné pro všechna měření uvedená v Tab. 7. jsou následující:

Bylo vždy dávkováno 5 – 10 µl roztoku v závislosti na odezvě detektoru.

Teplota: 30°C

Tab. 7.: Chromatografické podmínky při analýze směsi standardů na koloně SUPELCOSIL LC – SCX

Složky mobilní fáze	Poměr složek mobilní fáze	Průtoková rychlost (ml/min)
ACN : voda	50 : 50	0,5
	50 : 50	1
	40 : 60	0,8
	30 : 70	0,8
	10 : 90	0,6
	1 : 99	0,6
ACN : 0,1% AcAc	50 : 50	1
	40 : 60	1
	30 : 70	1
	20 : 80	1
	10 : 90	1
	5 : 95	1
ACN : 0,085% kys. fosforečná	40 : 60	1
	30 : 70	1
	20 : 80	1
	10 : 90	1

Na kolonu Discovery Zr – PBD 150 x 4,6 mm, 5 µm, byl nastříkovan roztok směsi všech standardů.

Parametr shodný pro všechna měření uvedená v Tab. 8. je:

Nástřík vzorku směsi všech standardů: 5 µl

Tab. 8.: Chromatografické podmínky při analýze směsi standardů na koloně Discovery Zr – PBD

Složky mobilní fáze	Poměr složek mobilní fáze	Teplota (°C)	Průtoková rychlost (ml/min)
ACN : 50 mM triethylammonium - hydroxid	25 : 75	35	1
	25 : 75	60	1
ACN : 25 mM fosforečnan sodný	60 : 40	60	0,7
	40 : 60	60	0,7
	20 : 80	60	0,7
	20 : 80	80	0,7
	10 : 90	80	0,7
	5 : 85	80	0,7
ACN : 0,0085% kys. fosforečná	50 : 50	80	0,7
ACN : 0,017% kys. fosforečná	50 : 50	80	0,7
	30 : 70	80	0,7

Na kolonu Discovery Zr – CarbonC18 75 x 4,6 mm, 5 µm, byl nastříkován roztok směsi všech standardů. Jednotlivé roztoky biopterinu, dihydroneopterinu, tetrahydroneopterinu a neopterinu byly nastříkovány tehdy, když bylo nutné identifikovat píky při analýze směsi.

Parametry shodné pro všechna měření uvedená v Tab. 9. jsou následující:

Bylo vždy dávkováno 5 – 10 µl roztoku v závislosti na odezvě detektoru.

Průtoková rychlost: 0,7 ml/min

Tab. 9.: Chromatografické podmínky při analýze směsi standardů na koloně Discovery Zr – CarbonC18

Složky mobilní fáze	Poměr složek mobilní fáze	Teplota (°C)
ACN : 25 mM fosforečnan sodný	40 : 60	60
	20 : 80	60
	5 : 95	80
ACN : 0,085% kys. fosforečná	50 : 50	80
	70 : 30	80
ACN : 0,0085% kys. fosforečná	50 : 50	80
	30 : 70	80
	70 : 30	80

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1. Vývoj metody – optimalizace chromatografických podmínek

Primárním cílem bylo ověřit retenci neopterinu a kreatininu za použití metody HILIC a následně provést separaci směsi všech pěti standardů. Za optimálních chromatografických podmínek byla provedena částečná validace metody. Protože výsledky nebyly plně uspokojivé, byly pro separaci směsi vyzkoušeny i další chromatografické kolony.

5.1.1. Testování kolony ZIC – HILIC

Jako první byla zkoušena kolona ZIC – HILIC 125 x 2,1 mm, 3,5 μm . V první fázi na ni byl nastříkovan roztok kreatininu o koncentraci 0,1 mg/ml a roztok neopterinu o koncentraci 0,001 mg/ml. Tyto dvě látky byly záměrně vybrány jako reprezentativní představitelé pro všech pět standardů, jelikož se u nich očekávalo dosti odlišné chromatografické chování. Byl také nastříkovan roztok jodidu draselného v acetonitrilu, který měl určovat mrtvý retenční čas.

Cílem těchto počátečních měření bylo zjistit orientační retenční časy kreatininu a neopterinu při použití různých mobilních fází a podle nich a ještě dalších chromatografických charakteristik vybrat vhodnou mobilní fázi pro analýzu směsi všech pěti standardů. Byl testován vliv pH pufru, koncentrace pufru a vliv procentuálního zastoupení organické a vodné složky v mobilní fázi.

Tab. 10.: Retenční časy neopterinu v minutách v závislosti na koncentraci vodné složky mobilní fáze, pH pufru a jeho koncentraci při pH 6,8

Konc.	Voda	10mM AmAc 6,8	100mM AmAc 6,8	50mM AmAc 6,8	50mM AmAc 4,8	50mM AmAc 3,8	50mM AmAc 5,8	50mM AmAc 7,8	0,5% AcAc	0,1% AcAc
5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10%	16,76	30	31	33	27	23,34	29,04	29,68	24,83	-
15%	6,28	9,82	10,82	11,65	10,07	8,88	10,49	10,71	9,26	9,65
20%	3,79	5,67	6,52	6,16	5,93	5,5	6,2	6,29	5,7	5,83
30%	4,71	3,56	3,75	3,9	3,62	3,56	3,7	3,73	3,65	3,67
40%	5,13	3	3,04	3,34	3	2,98	3,05	2,83	3,06	3,09
50%	4,14	2,73	2,69	3,25	2,71	2,73	2,61	3,5	2,78	2,91
60%	-	2,79	2,53	3,32	2,56	2,79	2,49	3,31	2,63	2,89

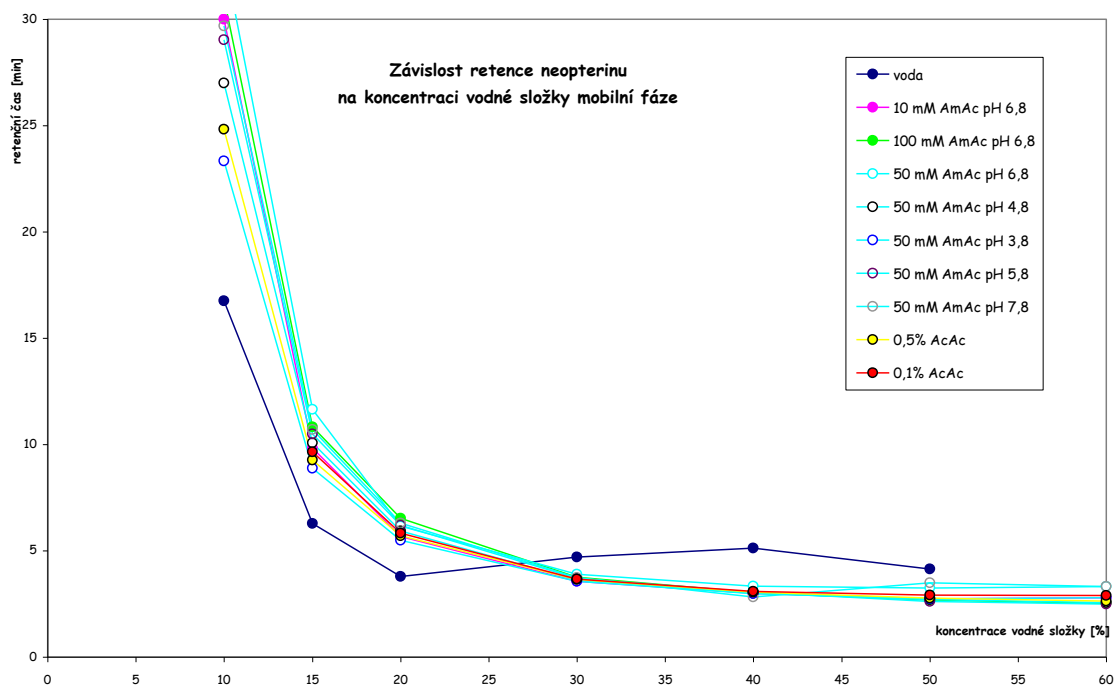
Tab. 11.: Retenční časy kreatininu v minutách v závislosti na koncentraci vodné složky mobilní fáze, pH pufru a jeho koncentraci při pH 6,8

Konc.	Voda	10 mM AmAc 6,8	100 mM AmAc 6,8	50 mM AmAc 6,8	50 mM AmAc 4,8	50 mM AmAc 3,8	50 mM AmAc 5,8	50 mM AmAc 7,8	0,5% AcAc	0,1% AcAc
5%	-	10,21	9,78	11,07	10,86	12,54	10,54	-	-	-
10%	6,62	5,18	5,3	5,42	5,43	5,79	5,29	5,3	-	-
15%	4,17	3,77	3,86	3,97	3,96	4,48	3,84	3,87	22,17	-
20%	3,44	3,19	3,24	3,22	3,25	3,89	3,25	3,27	13,6	24,25
30%	5,01	2,65	2,63	2,76	2,68	3,42	2,68	2,71	7,5	12,25
40%	5,07	2,42	2,36	2,61	2,44	3,26	2,42	2,46	5,61	8,76
50%	4,75	2,35	2,21	2,57	2,31	3,01	2,17	3,04	4,37	7,1
60%	-	2,46	2,14	2,76	2,25	3,3	2,1	2,91	3,82	5,56

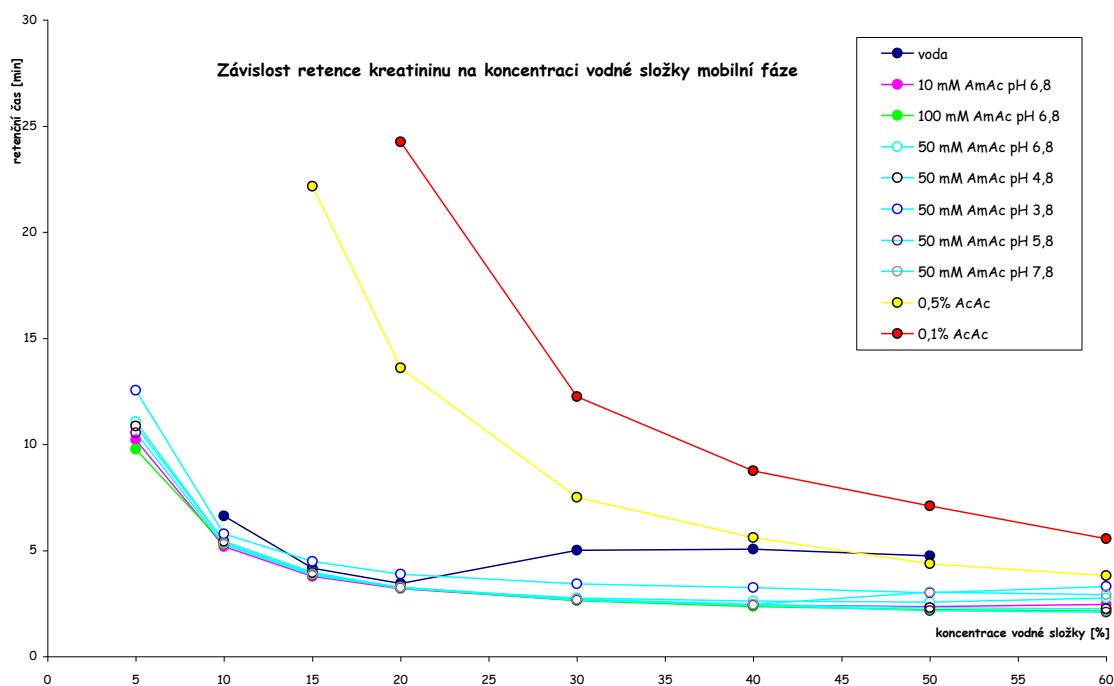
Tab. 12.: Retenční časy jodidu draselného v minutách v závislosti na koncentraci vodné složky mobilní fáze, pH pufru a jeho koncentraci při pH 6,8

Konc.	Voda	10 mM AmAc 6,8	100 mM AmAc 6,8	50 mM AmAc 6,8	50 mM AmAc 4,8	50 mM AmAc 3,8	50 mM AmAc 5,8	50 mM AmAc 7,8	0,5% AcAc	0,1% AcAc
5%	-	4,04	5,59	4,42	4,46	-	4,7	5,03	-	-
10%	1,68	3,2	4,05	3,51	3,46	-	3,48	3,69	6,1	-
15%	1,42	2,77	3,46	3,14	3,14	-	3,12	3,18	4,39	4,66
20%	1,42	2,09	3,12	2,86	2,84	-	2,85	2,88	3,51	3,63
30%	2,91	1,81	2,73	2,54	2,59	-	2,55	2,53	2,88	3,7
40%	3,31	1,74	2,57	2,51	2,51	2,19	2,42	2,73	2,41	3,3
50%	2,57	1,79	2,52	2,61	2,5	2,3	2,32	3,27	2,34	3,13
60%	-	1,96	2,51	2,89	2,61	4,09	2,37	3,35	2,48	3,14

Jak vyplývá z předcházejících tabulek, jodid draselný není nejvhodnějším indikátorem mrtvého retenčního času v systému HILIC, neboť několikrát měl delší retenční čas než neopterin nebo kreatinin. Při metodě HILIC totiž dochází k interakcím analytu se stacionární fází i díky elektrostatickým silám, a tak lze tuto metodu použít pro analýzu iontových látek, což bylo experimentálně potvrzeno.



Obr. 4.: Závislost retence neopterinu na koncentraci vodné složky mobilní fáze



Obr. 5.: Závislost retence kreatininu na koncentraci vodné složky mobilní fáze

Druh vodné složky mobilní fáze (voda, pufr, kyselina octová) více ovlivňoval retenci u kreatininu, u neopterinu byl průběh závislosti retenčních časů na koncentraci různých vodných složek mobilní fáze podobný. Použití různého pH u octanu amonného, ani jeho různé koncentrace při stejném pH neměly příliš velký dopad na změnu retence ani v jednom případě. Naproti tomu změna koncentrace kyseliny octové na retenční časy kreatininu vliv měla, nižší koncentrace kyseliny octové způsobila vyšší retenci kreatininu.

Retenční časy kreatininu se začaly rapidně zvedat při koncentraci nižší než 10% octanu amonného v mobilní fázi a při koncentraci nižší než 30% kyseliny octové v mobilní fázi. U neopterinu začaly rapidně narůstat retenční časy při koncentracích nižších než 20% vodné složky v mobilní fázi.

Pro analýzu pracovního roztoku směsi všech standardů byly vybrány následující mobilní fáze:

acetonitril : 0,5% kyselina octová, v rozmezí koncentrace acetonitrilu 70 – 90%

acetonitril : 50 mM octan amonný pH 3,8; v rozmezí koncentrace acetonitrilu 80 – 90%

acetonitril : 50 mM octan amonný pH 4,8; v rozmezí koncentrace acetonitrilu 80 – 90%

acetonitril : 50 mM octan amonný pH 7,8; v rozmezí koncentrace acetonitrilu 80 – 90%

Tab. 13.: Hodnoty parametrů testu způsobilosti systému při vybraných mobilních fázích pro neopterin

Mobilní fáze acetonitril : 0,5% kyselina octová						
Podíl acetonitrilu v mobilní fázi	t_r	A	As	R_S	N	HETP
70% ACN	3,65	17651720	1,71	0,7	368	408,07
80% ACN	5,70	15682130	1,74	0,9	497	302,02
85% ACN	9,27	14127469	1,77	2,1	585	256,53
90% ACN	24,83	11807509	1,73	3,3	892	168,11
Mobilní fáze acetonitril : 50 mM octan amonný pH 3,8						
Podíl acetonitrilu v mobilní fázi	t_r	A	As	R_S	N	HETP
80% ACN	5,50	11396761	1,73	1,6	371	404,21
85% ACN	8,89	10057500	1,71	0,8	487	307,82
90% ACN	23,34	7348254	1,74	6,3	658	227,89
Mobilní fáze acetonitril : 50 mM octan amonný pH 4,8						
Podíl acetonitrilu v mobilní fázi	t_r	A	As	R_S	N	HETP
80% ACN	5,93	9899915	1,59	1,0	325	462,18
85% ACN	10,07	8848591	1,36	2,5	619	242,33
90% ACN	27,00	7478093	1,75	3,6	499	300,65
Mobilní fáze acetonitril : 50 mM octan amonný pH 7,8						
Podíl acetonitrilu v mobilní fázi	t_r	A	As	R_S	N	HETP
80% ACN	6,29	9809024	1,43	2,6	466	321,99
85% ACN	10,71	9014472	1,42	0,7	687	218,36
90% ACN	29,68	7709766	1,34	6,7	769	195,05

Tab. 14.: Hodnoty parametrů testu způsobilosti systému při vybraných mobilních fázích pro kreatinin

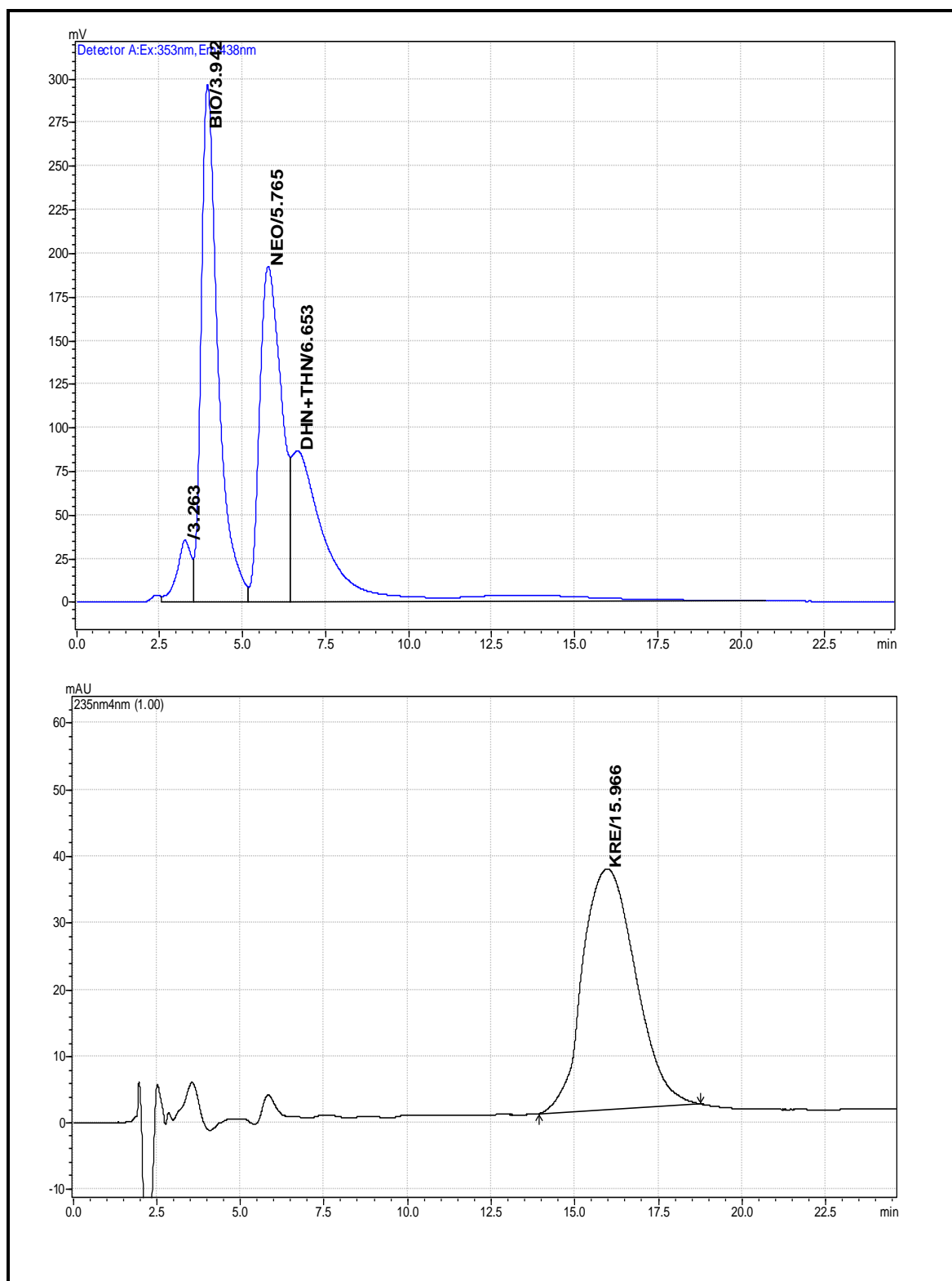
Mobilní fáze acetonitril : 0,5% kyselina octová						
Podíl acetonitrilu v mobilní fázi	t_r	A	A_s	R_s	N	HETP
70% ACN	7,50	5076823	1,56	6,2	547	274,14
80% ACN	13,60	6481461	1,24	4,8	497	301,81
85% ACN	22,17	7751280	1,09	5,3	344	435,92
90% ACN	NEBYLO ANALYZOVÁNO					
Mobilní fáze acetonitril : 50 mM octan amonný pH 3,8						
Podíl acetonitrilu v mobilní fázi	t_r	A	A_s	R_s	N	HETP
80% ACN	3,89	19966465	1,73	2,9	299	501,37
85% ACN	4,48	21603540	1,71	0,2	257	582,79
90% ACN	5,79	22634693	1,44	1,0	220	681,83
Mobilní fáze acetonitril : 50 mM octan amonný pH 4,8						
Podíl acetonitrilu v mobilní fázi	t_r	A	A_s	R_s	N	HETP
80% ACN	3,26	20904751	1,81	1,7	223	671,96
85% ACN	3,96	22152745	1,51	1,1	329	456,51
90% ACN	5,43	22480654	1,37	2,1	249	602,59
Mobilní fáze acetonitril : 50 mM octan amonný pH 7,8						
Podíl acetonitrilu v mobilní fázi	t_r	A	A_s	R_s	N	HETP
80% ACN	3,28	21336259	1,95	2,0	336	446,66
85% ACN	3,87	21525795	1,91	-	313	478,75
90% ACN	5,30	22296483	1,57	0,8	189	792,72

Účinnost chromatografického systému pro neopterin obecně rostla s vyšším obsahem acetonitrilu v mobilní fázi, vůbec nejlepších výsledků bylo dosaženo použitím 0,5% kyseliny octové jako vodné složky mobilní fáze. Účinnost pro kreatinin byla celkově dosti nízká a s rostoucím obsahem acetonitrilu v mobilní fázi naopak spíše klesala.

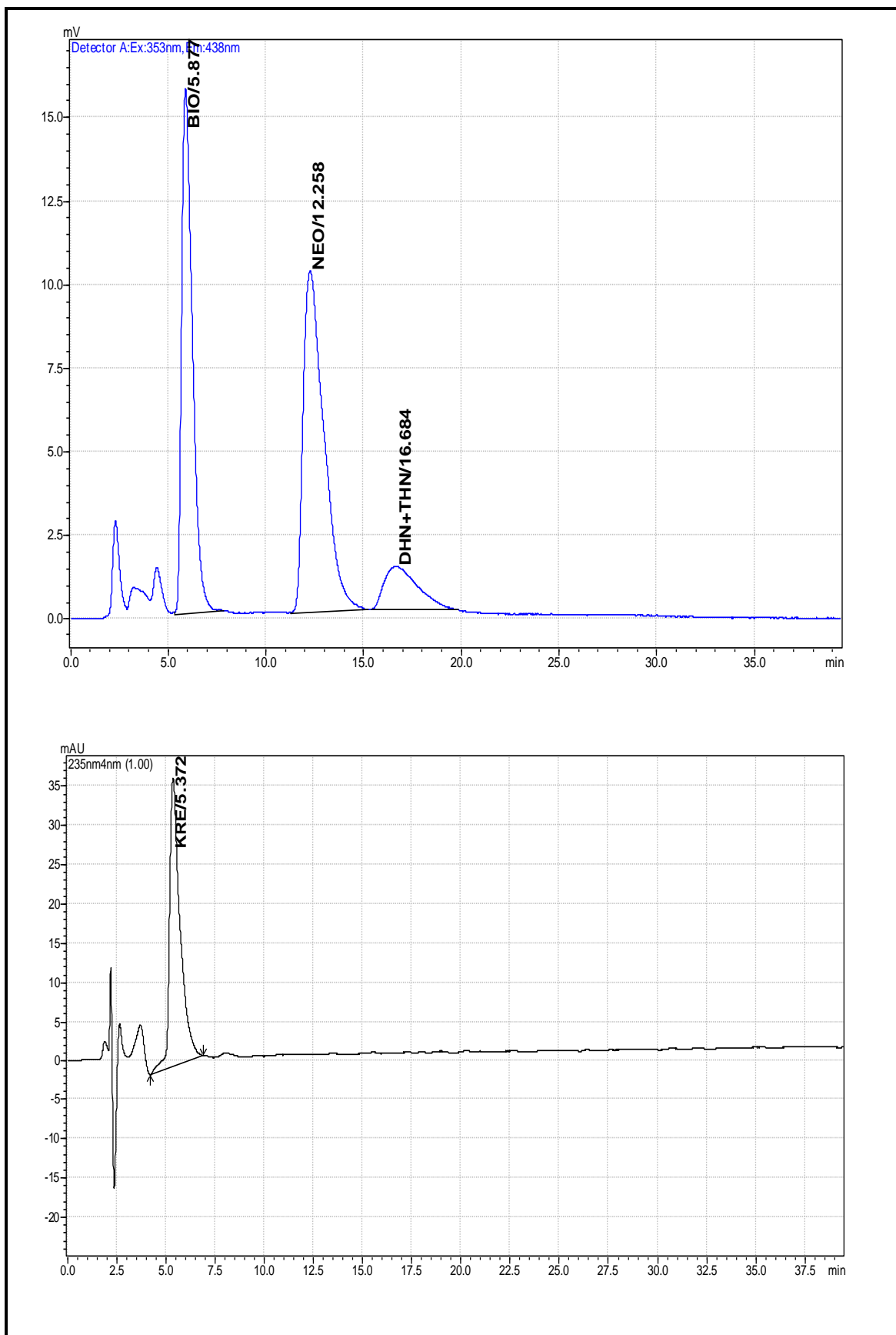
Rozlišení u neopterinu opět stoupalo s rostoucí koncentrací acetonitrilu v mobilní fázi, při jeho nižších koncentracích neodpovídalo rozlišení požadavkům. Nejlepšího rozlišení u kreatininu bylo dosaženo použitím 0,5% kyseliny octové jako vodné složky mobilní fáze.

Obě látky odpovídaly při všech zkoušených mobilních fázích požadavkům na asymetrii chromatografických pík podle USP, ale požadavek dle ČL ($A_s < 1,5$) byl splněn jen při použití octanu amonného o pH 4,8. Nejsymetričtější píky neopterinu byly dosaženy za použití 50 mM octanu amonného o pH 7,8 jako vodné složky. U kreatininu byly píky obecně symetričtější při vyšších koncentracích acetonitrilu v mobilní fázi. Nejsymetričtější píky kreatininu byly dosaženy za použití 0,5% kyseliny octové jako vodné složky.

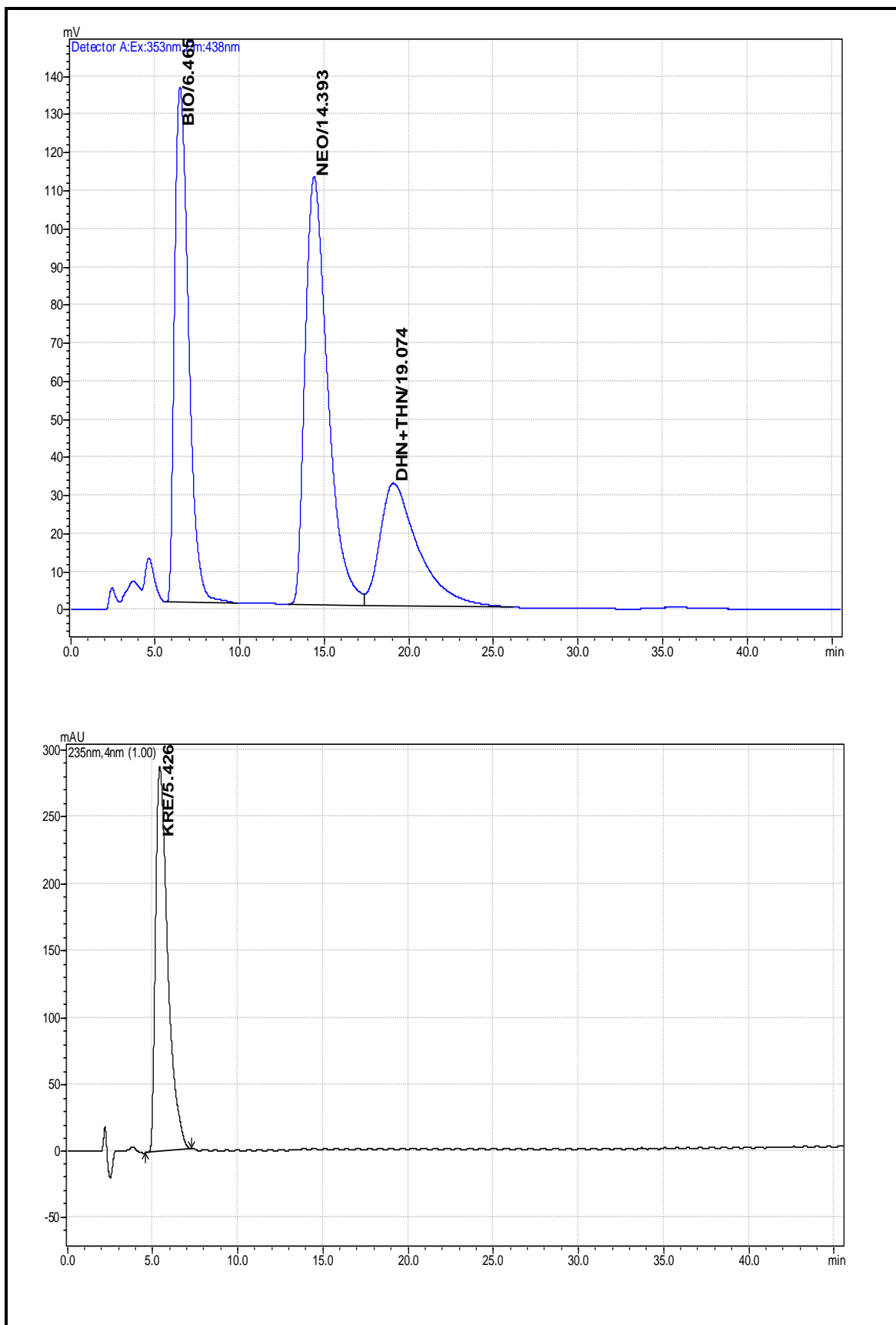
Následuje přehled separace směsi pteridinů za podmínek vyhodnocených jako optimální pro analýzu této směsi:



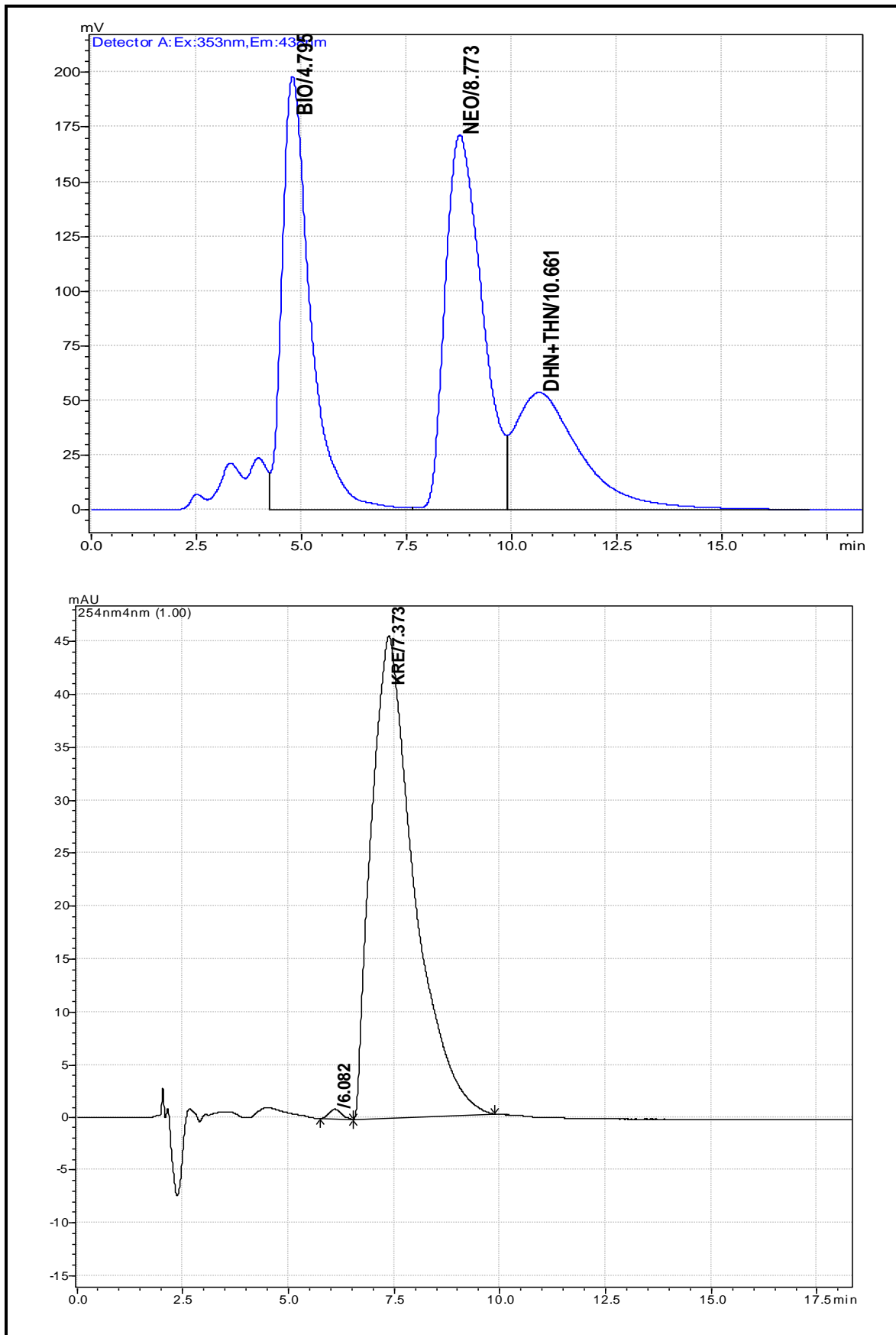
Obr. 6.: Acetonitril : 0,5% kys. octová 80 : 20



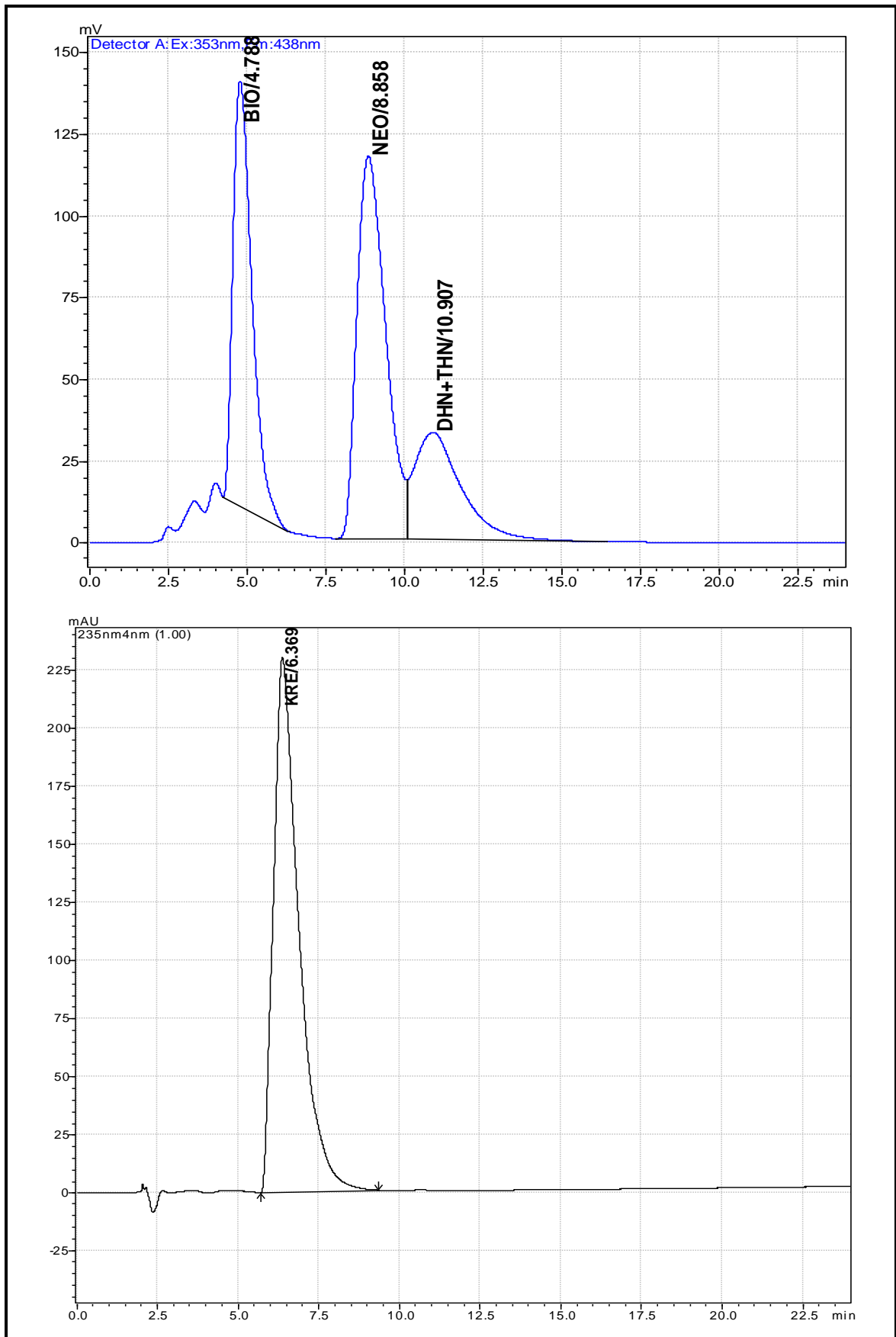
Obr. 7.: Acetonitril : 0,5% kys. octová 87 : 13



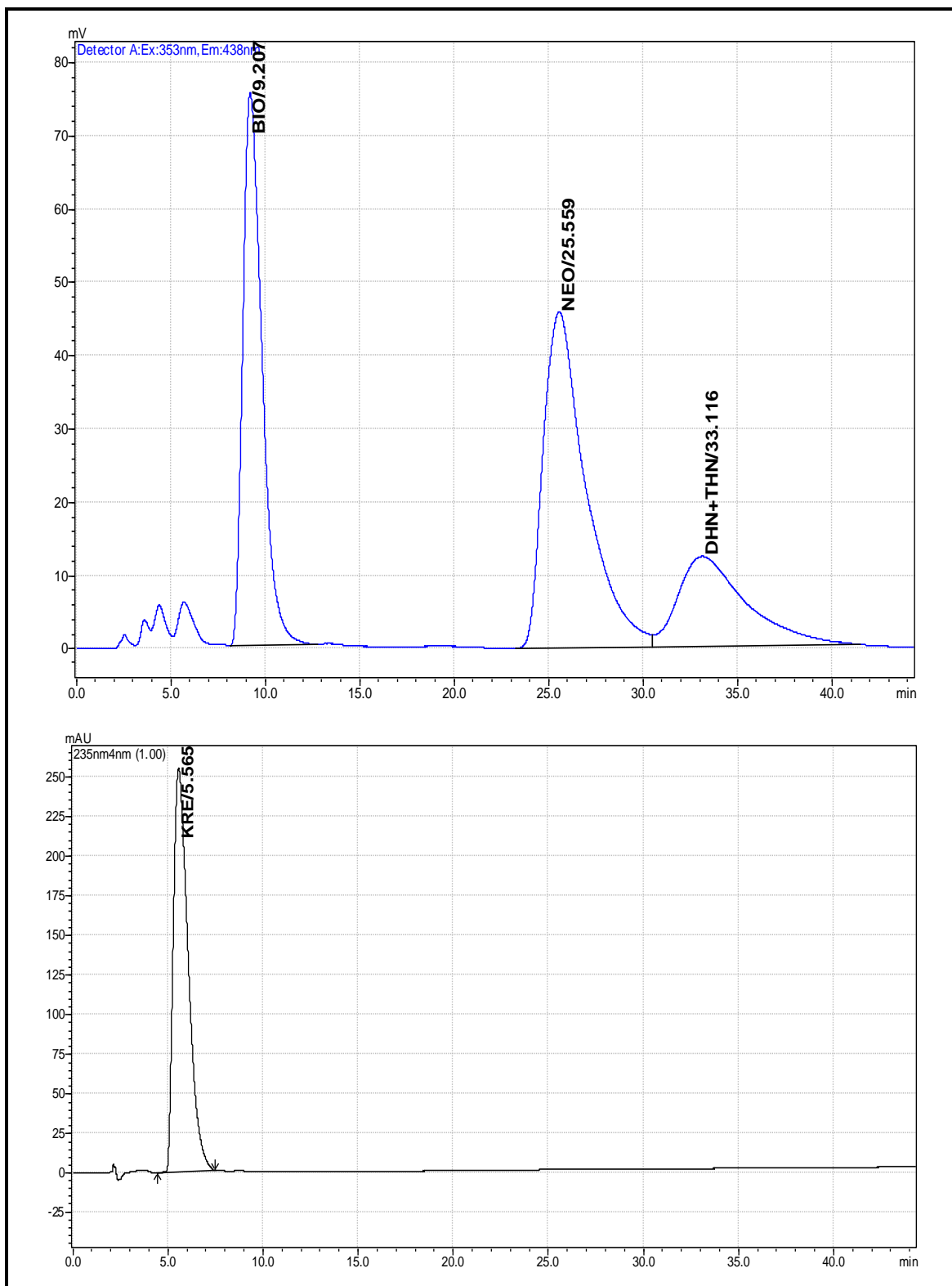
Obr. 8.: Acetonitril : 0,5% kys. octová 88 : 12



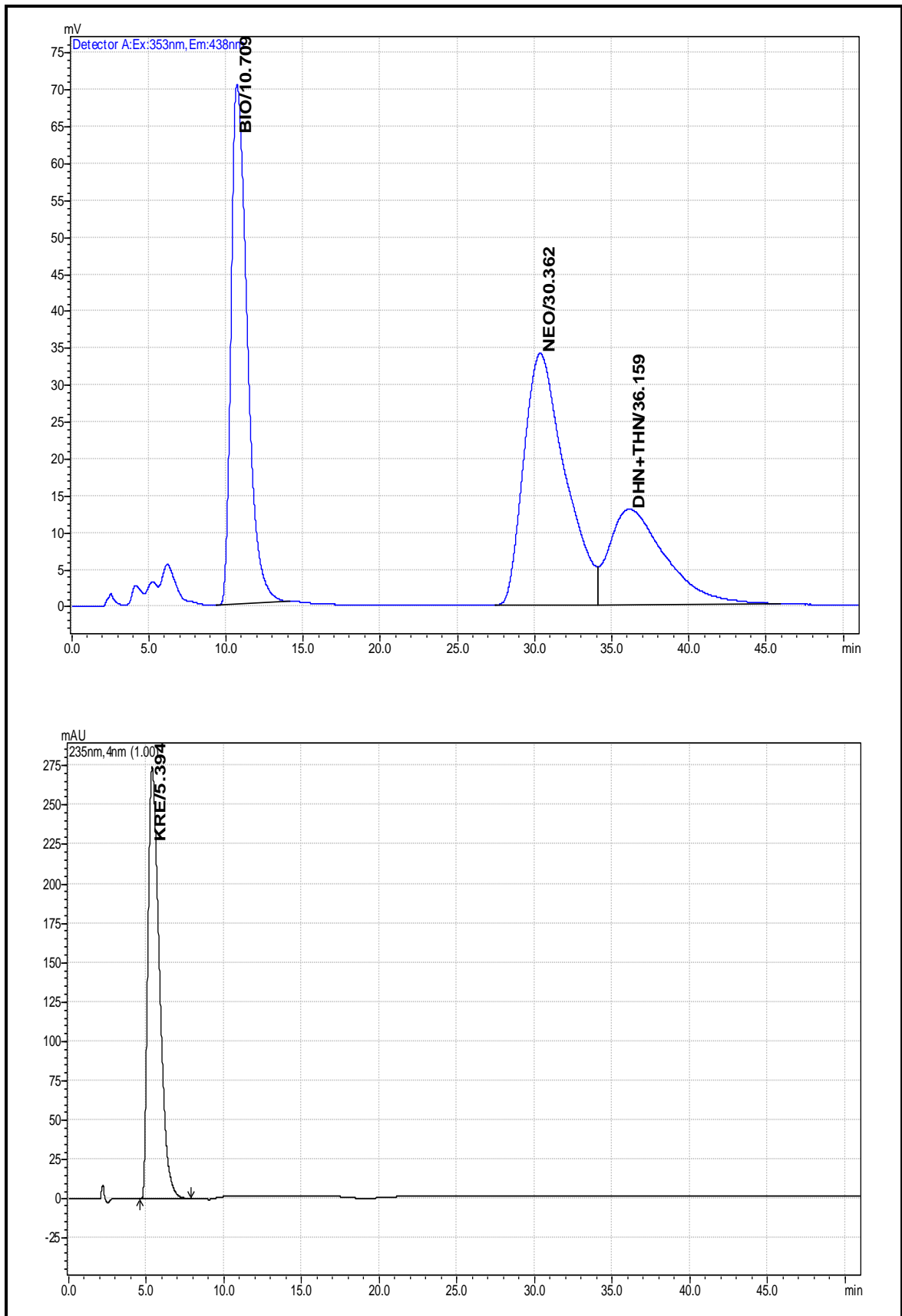
Obr. 9.: Acetonitril : 50 mM octan amonný pH 3,8 85 : 15



Obr. 10.: Acetonitril : 50 mM octan amonný pH 4,8 85 : 15



Obr. 11.: Acetonitril : 50 mM octan amonný pH 4,8 90 : 10



Obr. 12.: Acetonitril : 50 mM octan amonný pH 7,8 90 : 10

Na koloně ZIC – HILIC se za daných vybraných podmínek vesměs podařilo dosáhnout tří separovaných píků na fluorescenčním detektoru odpovídající pteridinům a jednoho píku na UV detektoru odpovídající kreatininu. Nepodařilo se však oddělit od sebe dihydroneopterin a tetrahydroneopterin. Jejich společný pík byl rozmytý. Pro jejich oddělení by byla zapotřebí chromatografická kolona s vyšší separační účinností, které se dá dosáhnout změnou sorbentu nebo zmenšením velikosti částic, což bohužel firma Sequant neposkytuje. Separační účinnost použité ZIC – HILIC kolony byla velmi nízká. Píky biopterinu, neopterinu a kreatininu byly vesměs symetrické. Při použití mobilních fází acetonitril + 0,5% kyselina octová v poměru 87 : 13, dále acetonitril + 0,5% kyselina octová v poměru 88 : 12 a acetonitril + 50 mM octan amonný pH 4,8 v poměru 90 : 10 se podařilo rozdělit píky až na základní linii, v posledních dvou případech však na úkor delší separační doby. Při použití acetonitrilu a 0,5% kyseliny octové jako mobilní fáze trvaly analýzy vždy zhruba do 25 minut. Při použití mobilní fáze složené z acetonitrilu a 50 mM octanu amonného o různém pH trvaly analýzy do 20 minut, avšak při koncentracích acetonitrilu 90% a vyšších dokonce až 45 minut.

Po veškerých testováních ostatních chromatografických kolon byla nakonec jako optimální vybrána kolona ZIC – HILIC s mobilní fází složenou z acetonitrilu a 0,5% kyseliny octové v poměru 87 : 13.

5.1.2. Testování kolony SUPELCOSIL LC – SCX

Jako další byla zkoušena kolona SUPELCOSIL LC – SCX 250 x 3 mm, 5 µm. Na tuto byl již rovnou nastříkovan pracovní roztok směsi všech standardů bez předchozích analýz roztoků jednotlivých standardů. Zatímco při použití předchozí kolony ZIC – HILIC, která je limitována průtokem mobilní fáze i teplotou analýzy, bylo měněno pouze složení mobilní fáze, při analýzách používajících kolonu SUPELCOSIL LC – SCX bylo měněno nejen složení mobilní fáze, ale i její průtok. Byly použity následující mobilní fáze:

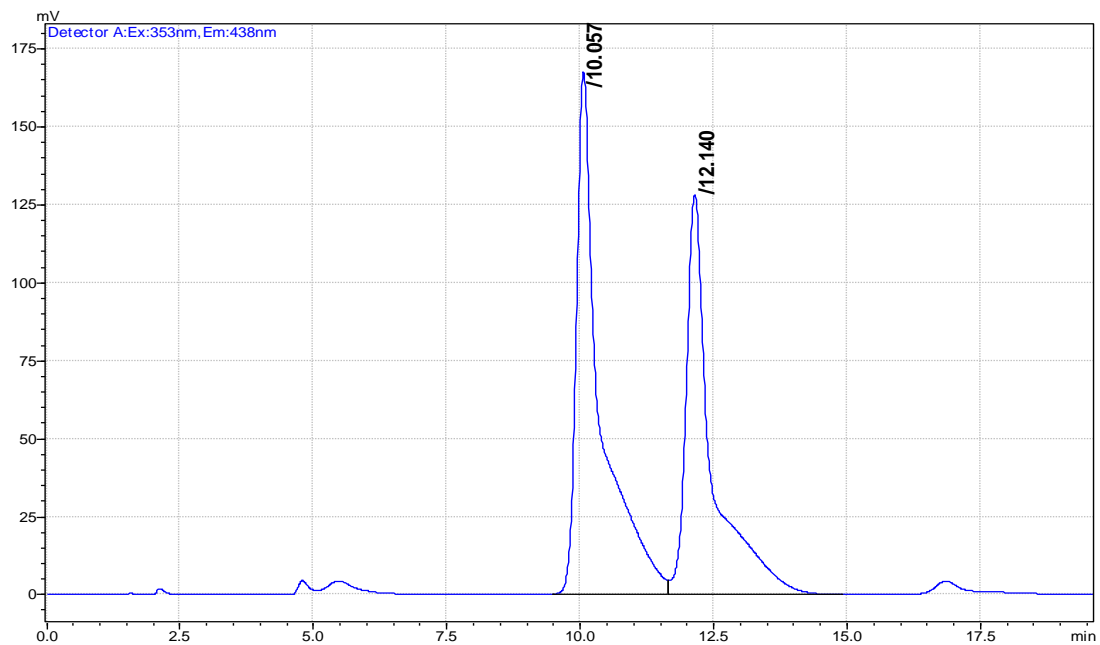
acetonitril : 0,1% kys. octová, v rozmezí koncentrace acetonitrilu 5 – 50%

acetonitril : 0,085% kys. fosforečná, v rozmezí koncentrace acetonitrilu 10 – 40%

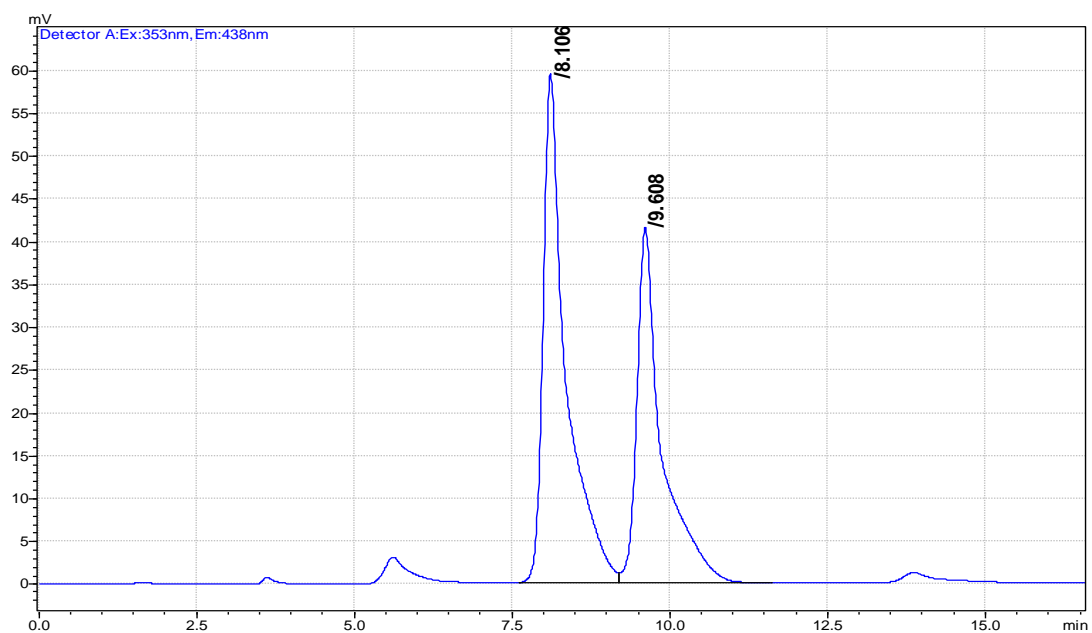
acetonitril : voda, v rozmezí koncentrace acetonitrilu 1 – 50%

Při použití mobilních fází acetonitril : 0,1% kys. octová a acetonitril : 0,085% kys. fosforečná nebyl vůbec zaznamenán pík kreatininu.

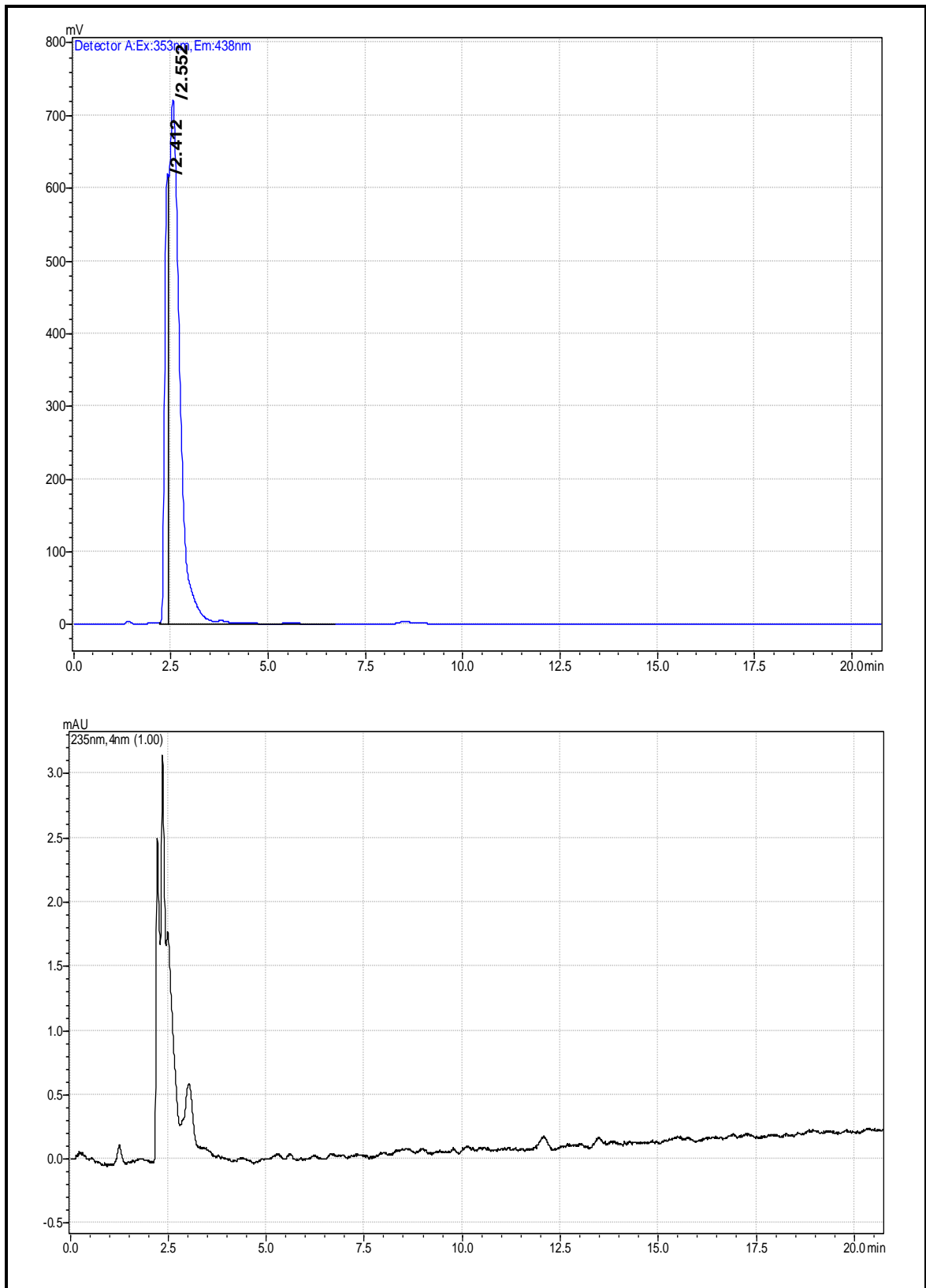
Byl také měněn průtok mobilní fáze. Ten se pohyboval od 0,5 ml/min do 1 ml/min. Jako nejvýhodnější se jevil vzhledem k tlakům na čerpadlech a rychlosti analýzy průtok 1 ml/min, který byl převážně využíván.



Obr. 13.: Acetonitril : 0,1% kys. octová 10 : 90
průtok 1 ml/min



Obr. 14.: Acetonitril : 0,085% kys. fosforečná 10 : 90
průtok 1 ml/min



Obr. 15.: Acetonitril : voda 1 : 99
průtok 0,6 ml/min

Při použití 0,1% kyseliny octové a 0,085% kyseliny fosforečné jako vodných složek mobilní fáze se objevily na fluorescenčním detektoru pouze dva píky pteridinů, jejichž tvar byl navíc nesouměrný. Při použití mobilní fáze složené z acetonitrilu a vody se dokonce na fluorescenčním detektoru objevil pouze jeden pík a na UV detektoru pík kreatininu, kdežto při předchozích měřeních s ostatními mobilními fázemi pík kreatininu nebyl eluován.

5.1.3. Testování kolony Discovery Zr – PBD

Byla zkoušena kolona Discovery Zr – PBD 150 x 4,6 mm, 5 μ m, a byl nastříkovan pracovní roztok směsi všech standardů. K dokonalejší separaci na zirkoniových kolonách je požadována vyšší teplota při analýzách (běžně je možno používat teploty do 100°C) a přítomnost pufru v mobilní fázi. Doporučeny jsou pufrы fluoridové, fosfátové, octanové a triethylammonium – hydroxid. Z toho vycházelo složení mobilních fází i celkové chromatografické podmínky. Bylo zkoušeno nejen různé složení mobilní fáze, ale i různé průtokové rychlosti mobilní fáze a také různé teploty analýzy. Byly použity následující mobilní fáze:

acetonitril : 50 mM triethylammonium – hydroxid, při koncentraci acetonitrilu 25%

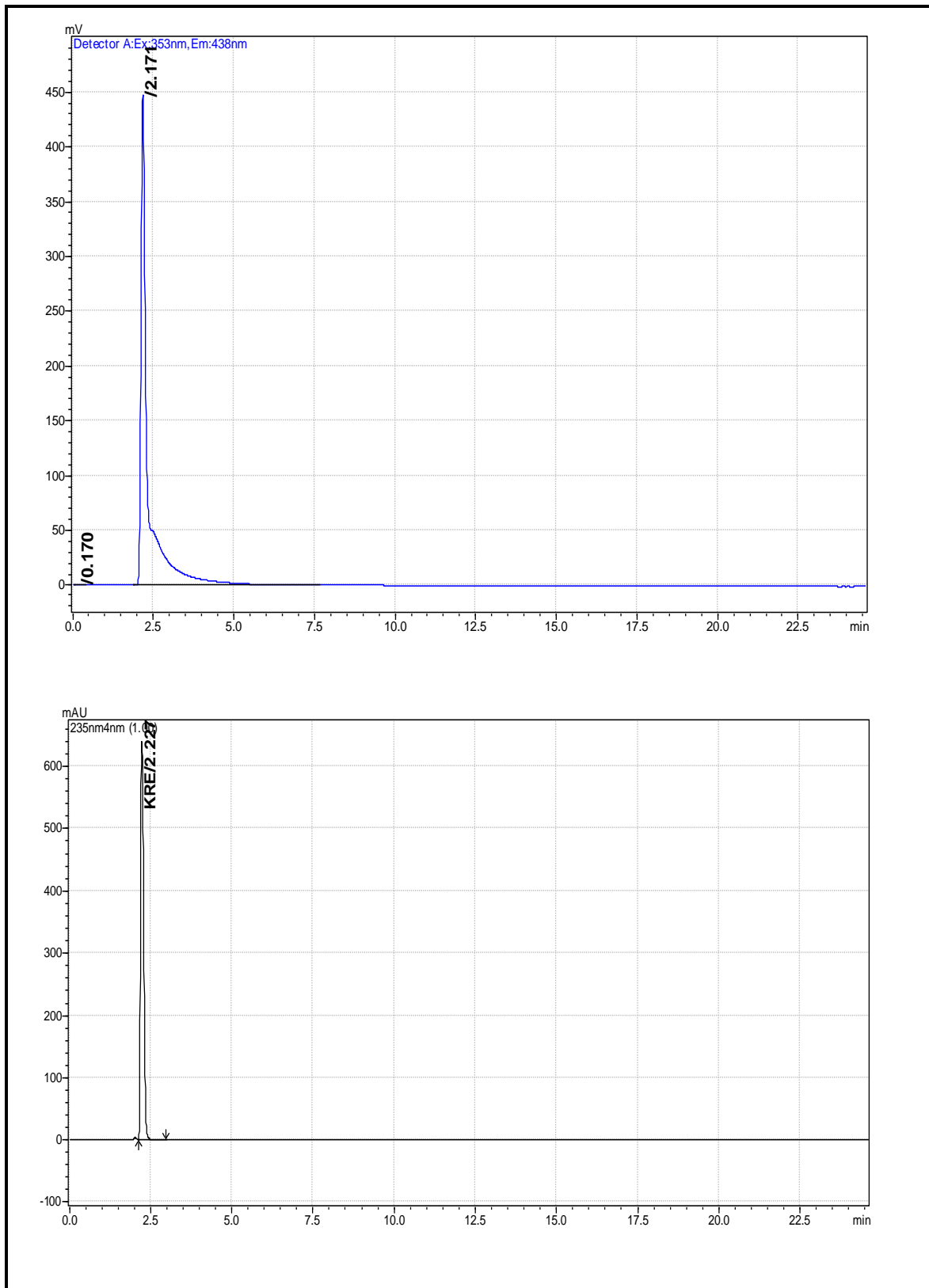
acetonitril : 25 mM fosforečnan sodný, v rozmezí koncentrace acetonitrilu 5 – 60%

acetonitril : 0,0085% kys. fosforečná, při koncentraci acetonitrilu 50%

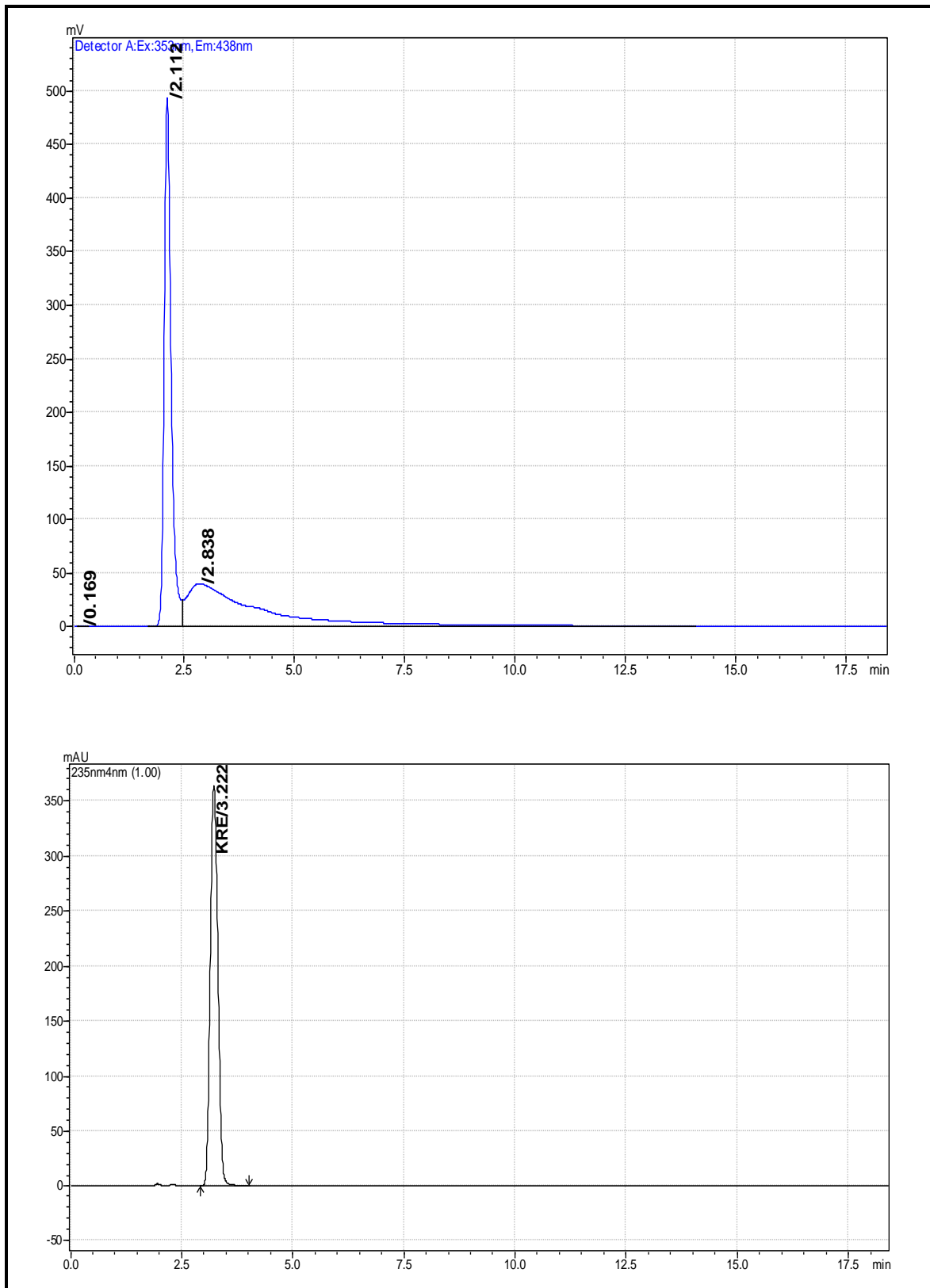
acetonitril : 0,017% kys. fosforečná, v rozmezí koncentrace acetonitrilu 30 – 50%

Tyto mobilní fáze byly vybrány zejména kvůli možnosti použít bazické pH.

Průtok mobilní fáze byl nastaven 0,7 nebo 1 ml/min, přičemž častěji byl používán vyšší průtok. Teplota analýzy se pohybovala od 35 do 80°C. Vyšší teplota měla umožnit dokonalejší a rychlejší separaci látek.



Obr. 16.: Acetonitril : 25 mM fosforečnan sodný 10 : 90
průtok 0,7 ml/min, teplota 80°C



Obr. 17.: Acetonitril : 0,017% kys. fosforečná 30 : 70
průtok 0,7 ml/min, teplota 80°C

Při separaci směsi na této koloně byl získán jeden pík na fluorescenčním detektoru a pík kreatininu na UV detektoru. Při použití mobilní fáze složené z acetonitrilu a 0,17% kyseliny fosforečné byly získány na fluorescenčním detektoru dva píky, z nichž druhý byl značně rozmytý.

5.1.4. *Testování kolony Discovery Zr – CarbonC18*

Byla použita kolona Discovery Zr – CarbonC18 75 x 4,6 mm, 3 µm, a byl nastříkovan pracovní roztok směsi všech standardů. Bylo zkoušeno různé složení mobilní fáze a různé teploty analýzy, průtok mobilní fáze byl ponechán konstantní 0,7 ml/min. Byly použity následující mobilní fáze, přičemž se vycházelo z doporučení výrobce:

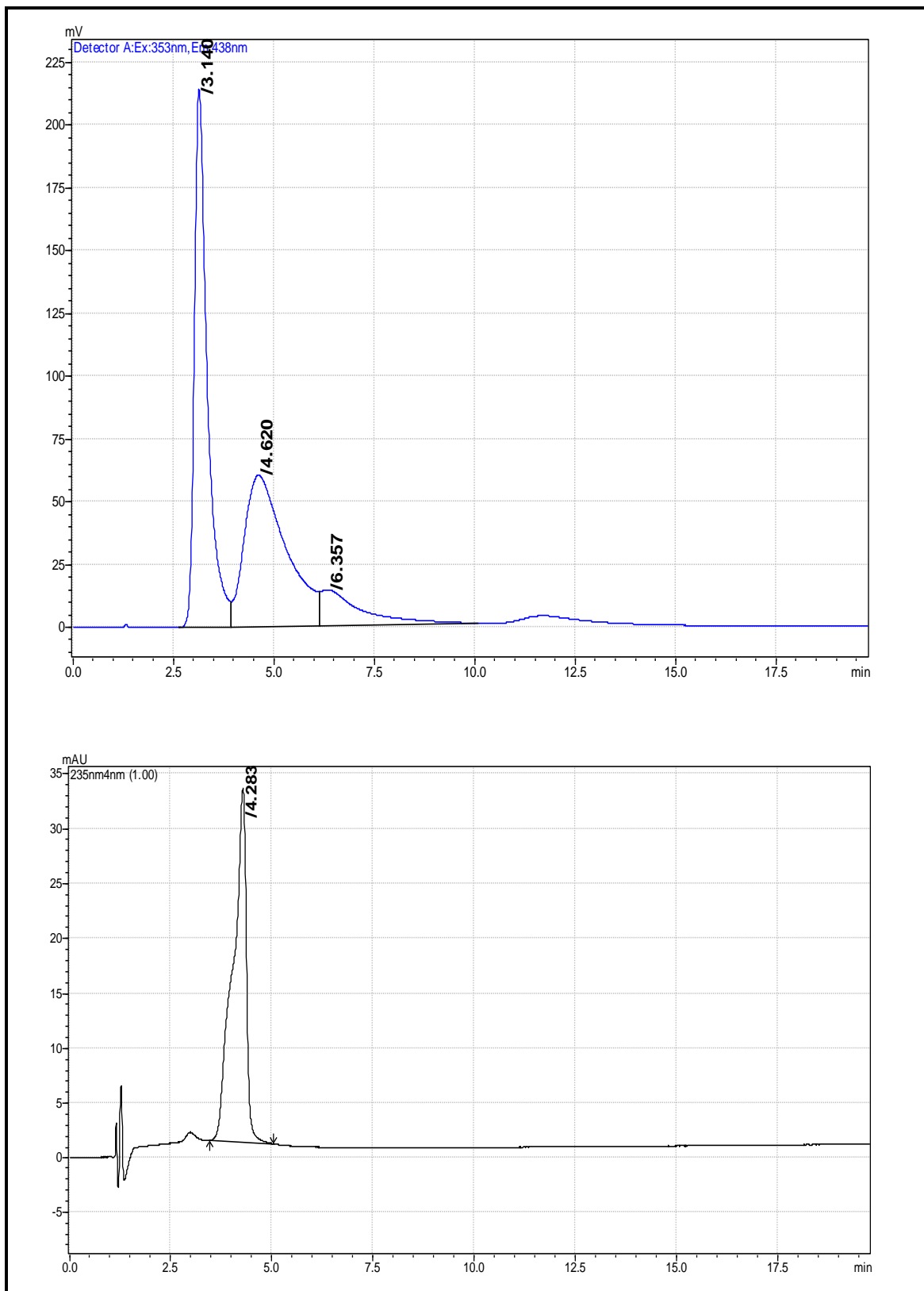
acetonitril : 0,0085% kys. fosforečná, v rozmezí koncentrace acetonitrilu 30 – 70%

acetonitril : 0,085% kys. fosforečná, v rozmezí koncentrace acetonitrilu 50 – 70%

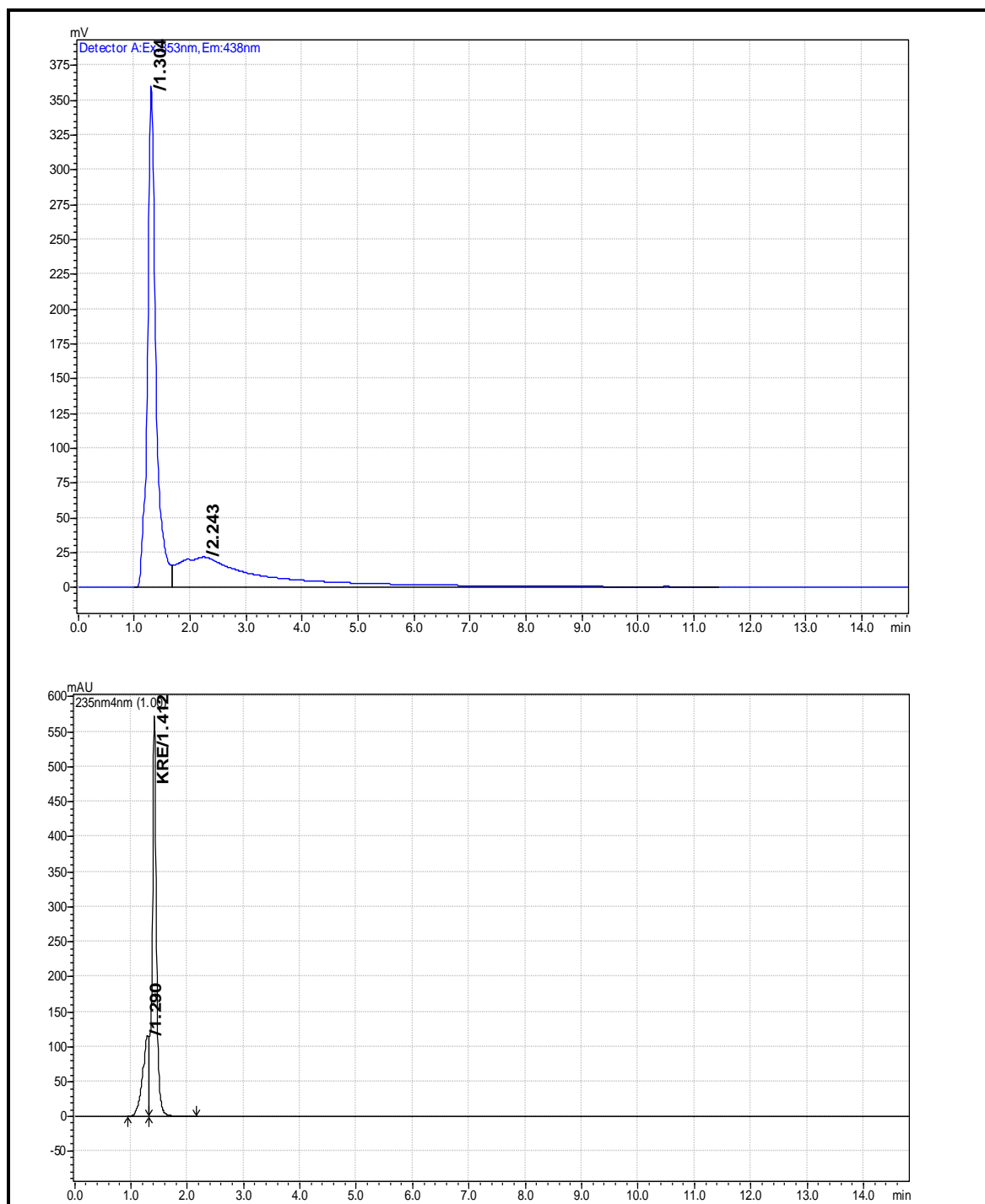
acetonitril : 25 mM fosforečnan sodný, v rozmezí koncentrace acetonitrilu 5 – 40%

Při mobilních fázích acetonitril : 0,085% kyselina fosforečná 70 : 30, acetonitril : 0,0085% kyselina fosforečná 50 : 50 a 70 : 30 nebyl vůbec eluován pík kreatininu.

Teplota analýzy byla nastavena na 60 nebo 80°C, přičemž vyšší teplota měla umožnit lepší separaci látek.



Obr. 18.: Acetonitril : 0,0085% kys. fosforečná 30 : 70
teplota 80°C



Obr. 19.: Acetonitril : 25 mM fosforečnan sodný 5 : 95
teplota 80°C

Na koloně Discovery Zr – CarbonC18 byly, při použití mobilní fáze složené z acetonitrilu a 25 mM fosforečnanu sodného, separovány dva píky na fluorescenčním detektoru, přičemž druhý pík byl rozmytý, a pík kreatininu na UV detektoru. Při použití mobilní fáze složené z acetonitrilu a 0,0085% kyseliny fosforečné byly separovány na

fluorescenčním detektoru tři píky, které však byly rozmyté a nebyly rozdělené až na základní linii. Ani pík kreatininu nebyl při této mobilní fázi souměrný.

Na kolonách pro chromatografii na obrácených fázích bohužel nebylo dosaženo lepších výsledků, validace proto byla provedena na koloně ZIC – HILIC.

5.2. Validace metody HILIC

Testované validační parametry:

1. Test způsobilosti systému:

Účinnost chromatografické kolony

Asymetrie chromatografických píků

Rozlišení chromatografických píků

Opakovatelnost analýzy (opakovatelnost plochy píku a opakovatelnost pro retenční čas)

2. Linearita a rozmezí kalibrace

Výše uvedené validační parametry byly už testovány za podmínek, které byly vyhodnoceny jako optimální pro analýzu směsi standardů. Hlavními kritérii při výběru těchto podmínek bylo co nejlepší možné rozdělení jednotlivých látek ve směsi a co nejkratší možná doba analýzy vzhledem k sériovému provádění velkého množství analýz v biologických vzorcích.

Optimální podmínky, při kterých byly měřeny validační parametry a které byly následně používány i pro analýzu sledovaných látek v biologickém materiálu, jsou:

Analytická kolona:	ZIC – HILIC 125 x 2,1 mm, 3,5 μ m
Mobilní fáze:	acetonitril : 0,5% kys. octová 87 : 13
Průtoková rychlost:	0,25 ml/min
Dávkovaný objem:	5 μ l
Teplota:	25°C
Detekce:	λ = 235 nm pro kreatinin λ (excitační) = 353 nm, λ (emisní) = 438 nm pro pteridiny

5.2.1. Test způsobilosti systému

Byl použit roztok směsi všech standardů určený pro SST o koncentraci pteridinů 400 nmol/l, který byl v rámci testu způsobilosti systému proměřován 10x.

Dihydroneopterin a tetrahydroneopterin byly hodnoceny jako jejich suma z jednoho píku.

Tab. 15.: Průměrné hodnoty validačních parametrů: účinnost chromatografické kolony, výškový ekvivalent teoretického patra a asymetrie chromatografických píků

Látka	Účinnost (N)	Výškový ekvivalent (H) v μm	Asymetrie (A_S)
BIO	486	308	1,64
DHN + THN	613	788	1,54
NEO	510	296	1,92
KRE	1021	152	1,65

Požadavek $N > 900$

Požadavek na počet teoretických pater N je splněn pouze pro kreatinin.

Použitá ZIC – HILIC kolona vykazovala celkově velmi nízkou separační účinnost, což je velmi negativní vlastnost vzhledem k poměrně vysoké ceně kolony.

Požadavek $A_S < 2,0$

Požadavek na asymetrii chromatografických píků je podle USP u všech látek splněn. Píky jsou symetrické.

Rozlišení chromatografických píků bylo měřeno pouze u biopterinu, sumy dihydroneopterinu + tetrahydroneopterinu a neopterinu, protože pík kreatininu byl zobrazen na jiném detektoru.

Tab. 16.: Průměrné hodnoty rozlišení chromatografických píků

Rozlišení (R_S) BIO : NEO	Rozlišení (R_S) NEO : DHN + THN
2,1	3,9

Požadavek $R_S > 1,5$

Píky hodnocených látek jsou od sebe dostatečně separovány. Požadavek na rozlišení chromatografických píků je splněn.

Tab. 17.: *Opakovatelnost plochy píku*

Látka	Průměrná plocha píku	Směrodatná odchylka	Relativní směrodatná odchylka (%)
Biopterin	670849	16713	2,49
Dihydroneopterin + tetrahydroneopterin	101220	23749	23,46
Neopterin	776358	7504	0,97

Požadavek RSD < 1%

Zkouška opakovatelnosti plochy píku pro kreatinin nesplnila příslušné limity, relativní směrodatná odchylka byla příliš vysoká.

Relativní směrodatná odchylka (RSD) je pouze u neopterinu menší než 1%. Jediný neopterin ze všech sledovaných látek splňuje podmínku opakovatelnosti nástřiku.

Zde se bohužel nepodařilo dosáhnout lepších výsledků. Vliv může mít stabilita, malá separační účinnost kolony i tvar píku.

Tab. 18.: *Opakovatelnost pro retenční čas*

Látka	Průměrný retenční čas (min)	Směrodatná odchylka	Relativní směrodatná odchylka (%)
Biopterin	5,88	0,02	0,31
Dihydroneopterin + tetrahydroneopterin	18,49	0,57	3,06
Neopterin	12,29	0,06	0,46
Kreatinin	11,56	0,98	8,46

Požadavek RSD < 1%

Biopterin a neopterin splňují podmínky pro opakovatelnost pro retenční čas. Kreatinin a suma dihydroneopterinu + tetrahydroneopterinu leží mimo tolerovanou relativní směrodatnou odchylku retenčního času. Metoda opět není vhodná pro kreatinin.

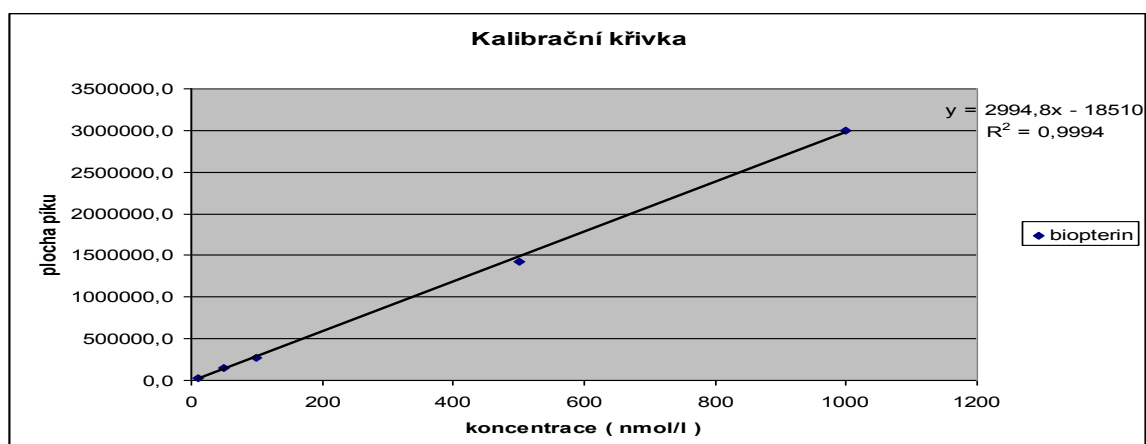
S kreatininem byl problém jak při opakovatelnosti plochy píku, tak při opakovatelnosti pro retenční čas, nepodařilo se prozatím zjistit důvod. Při použitých chromatografických podmínkách měl nereprodukovatelný retenční čas. Metoda pro stanovení kreatininu by byla zapotřebí dále upravit. Také u dihydroneopterinu + tetrahydroneopterinu byla velká chyba při testu opakovatelnosti. Bylo to dáno tím, že se jedná o sumu dvou píků, které se nepodařilo rozdělit, z toho vyplývá větší chyba při integraci, proto ani výsledky nemohou být přesné.

5.2.2. Linearita a rozmezí kalibrace

Kalibrační křivky všech sledovaných látek byly sestaveny z pěti kalibračních roztoků o koncentracích 10, 50, 100, 500 a 1000 nmol/l pteridinů a 0,1, 0,5, 1, 5 a 10 $\mu\text{mol/l}$ kreatininu. Každý kalibrační roztok byl měřen třikrát a obsahoval vždy směs všech pěti látek v daných koncentracích. Byly sestaveny jednotlivé kalibrační křivky a určeny jejich rovnice.

Tab. 19.: Kalibrační závislost biopterinu

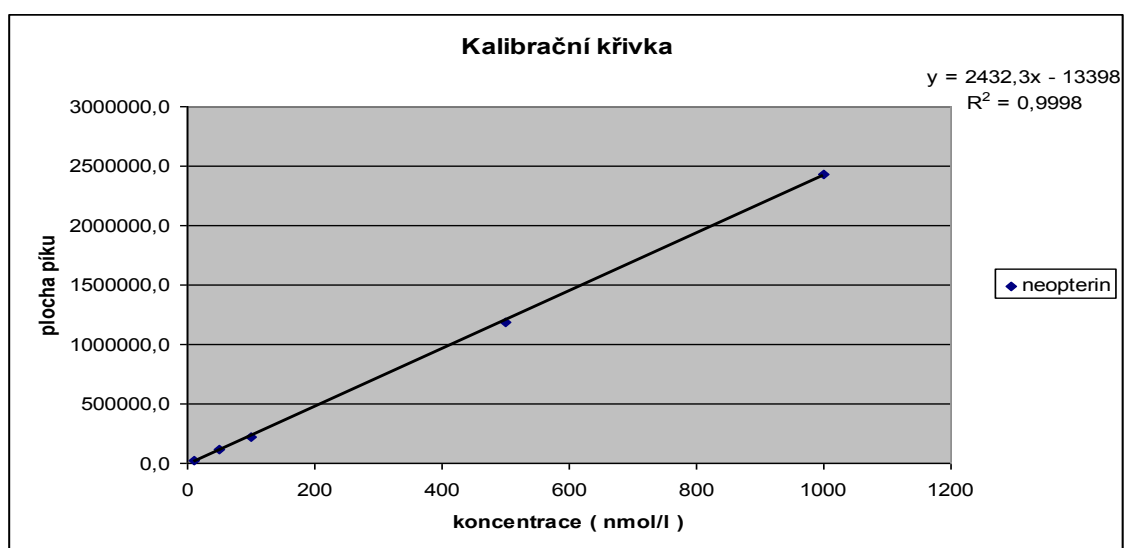
Koncentrace (nmol/l)	Plocha (průměr)	A ₁	A ₂	A ₃
10	28910	30411	27240	29079
50	144851	144710	144149	145696
100	275095	271315	279080	274892
500	1428998	1423667	1438515	1424813
1000	3000984	3001943	3004140	2996870



Obr. 20.: Kalibrační křivka biopterinu

Tab. 20.: Kalibrační závislost neopterinu

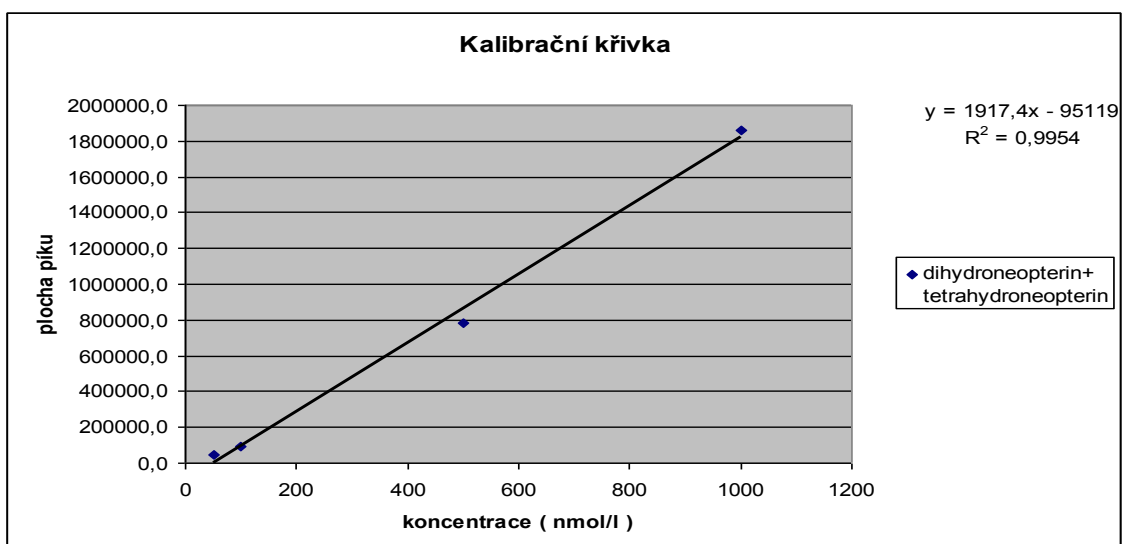
Koncentrace (nmol/l)	Plocha (průměr)	A ₁	A ₂	A ₃
10	23830	24933	23479	23080
50	112679	116825	111865	109347
100	220676	220075	226687	215268
500	1185203	1182808	1187425	1185377
1000	2428240	2426557	2427002	2431161



Obr. 21.: Kalibrační křivka neopterinu

Tab. 21.: Kalibrační závislost dihydroneopterinu + tetrahydroneopterinu

Koncentrace (nmol/l)	Plocha (průměr)	A ₁	A ₂	A ₃
10	0	0	0	0
50	43842	41356	48096	42076
100	96174	91079	103332	94113
500	782492	558731	884942	903804
1000	1860686	1844369	1872876	1864815



Obr. 22.: Kalibrační křivka dihydroneopterinu + tetrahydroneopterinu

Tab. 22.: Kalibrační závislost kreatininu

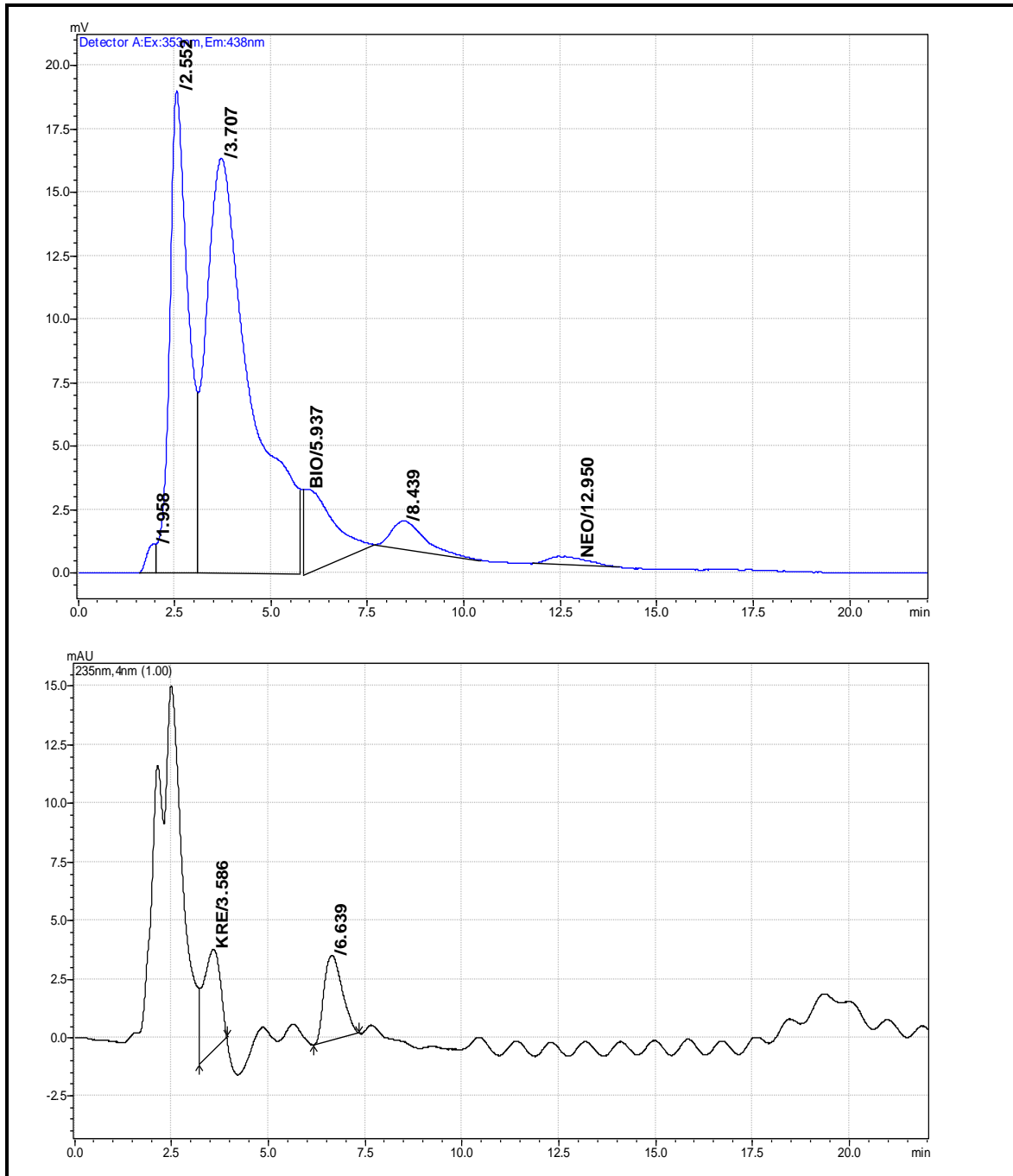
Koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	Plocha (průměr)	A ₁	A ₂	A ₃
0,1	96060	117286	83245	87651
0,5	83745	95444	76110	79682
1	71016	74318	70661	68069
5	63892	65095	65332	61250
10	-	-	-	-

Kalibrační křivky biopterinu, neopterinu, s výhradou pro směs dihydroneopterinu + tetrahydroneopterinu, byly v daném rozmezí koncentrací lineární. Kalibrační křivka kreatininu nebyla lineární, podmínky, za kterých byla prováděna kalibrace, nebyly vhodné pro kvantifikaci kreatininu. Kreatinin se tudíž nebude moci kvantifikovat ani v biologických vzorcích.

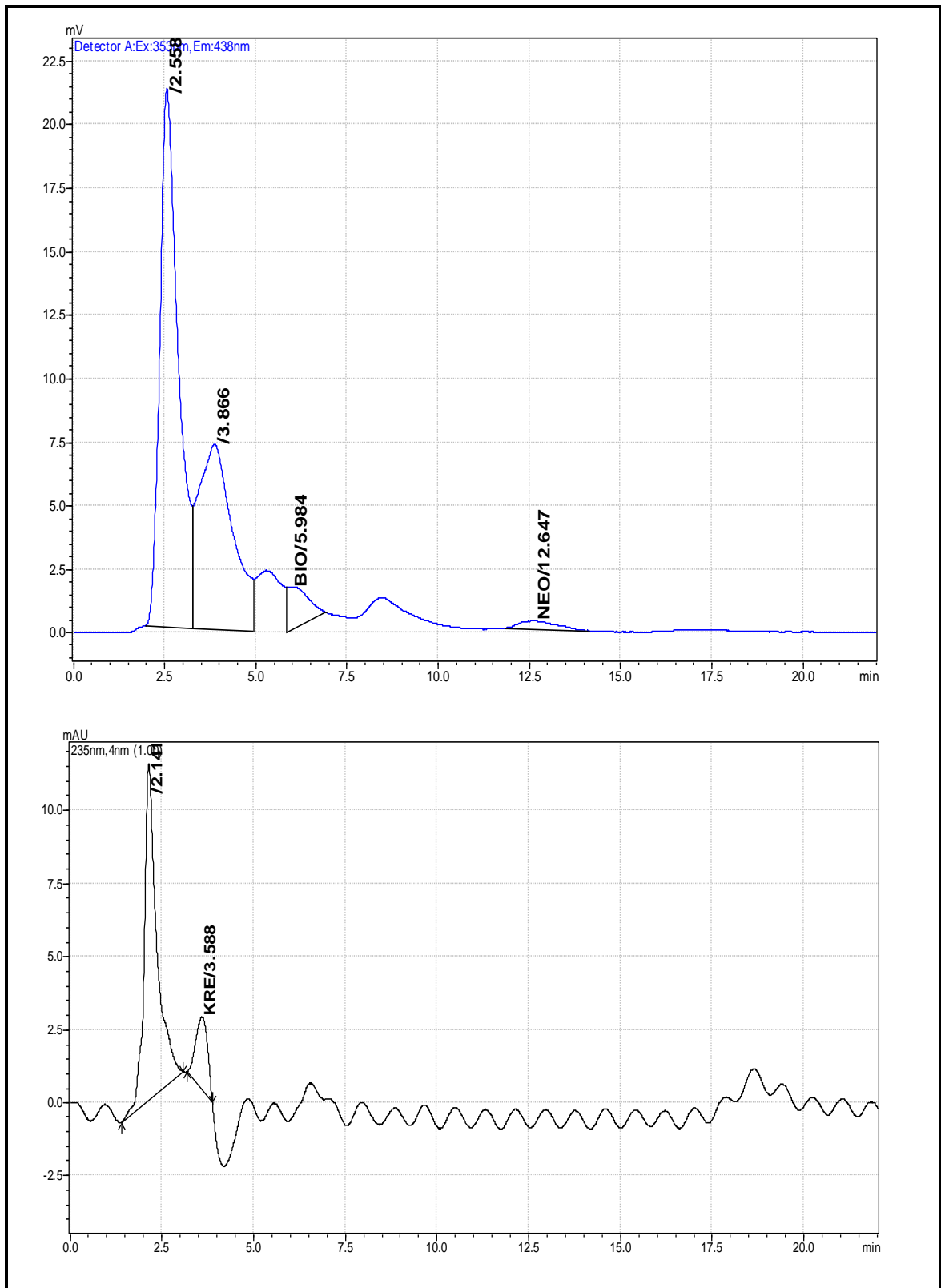
5.3. Stanovení sledovaných látek v biologickém materiálu

Byly analyzovány vzorky moči od pěti různých pacientů. Vzorky byly předem odstředěny podle metody Fakultní nemocnice Hradec Králové a pak naředěny 100 krát

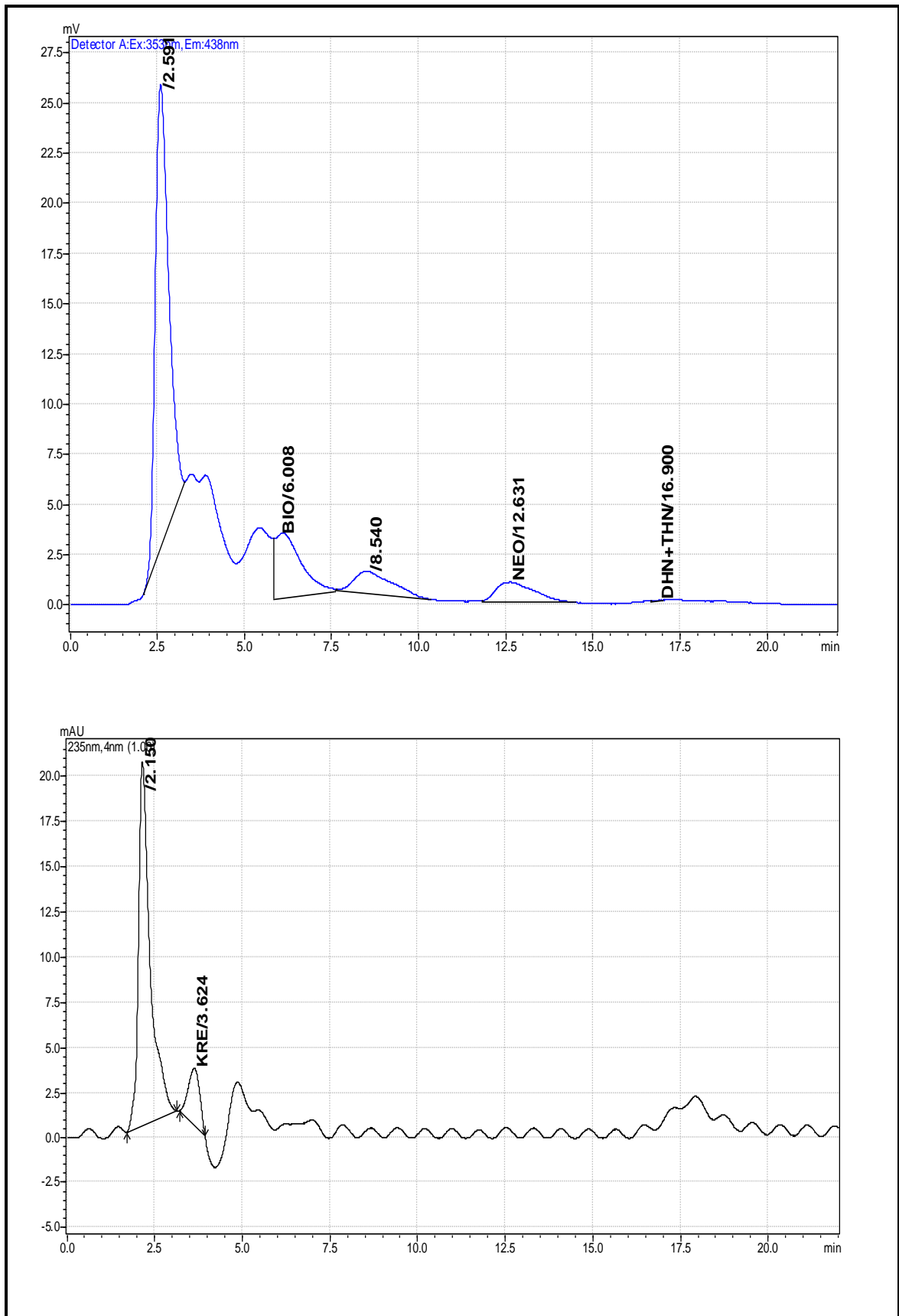
používanou mobilní fází přímo před analýzou. Analýza probíhala za shodných podmínek jako při validaci metody. Každý vzorek byl analyzován třikrát a z průměrné hodnoty plochy píku byla vypočtena koncentrace. Pro kvantifikaci látek v moči pacientů byly využity rovnice kalibračních křivek. V moči byly hodnoceny koncentrace biopterinu, neopterinu a dihydroneopterinu + tetrahydroneopterinu. Kreatinin nemohl být kvantifikován, jelikož celkově byla jeho odezva nereprodukovatelná.



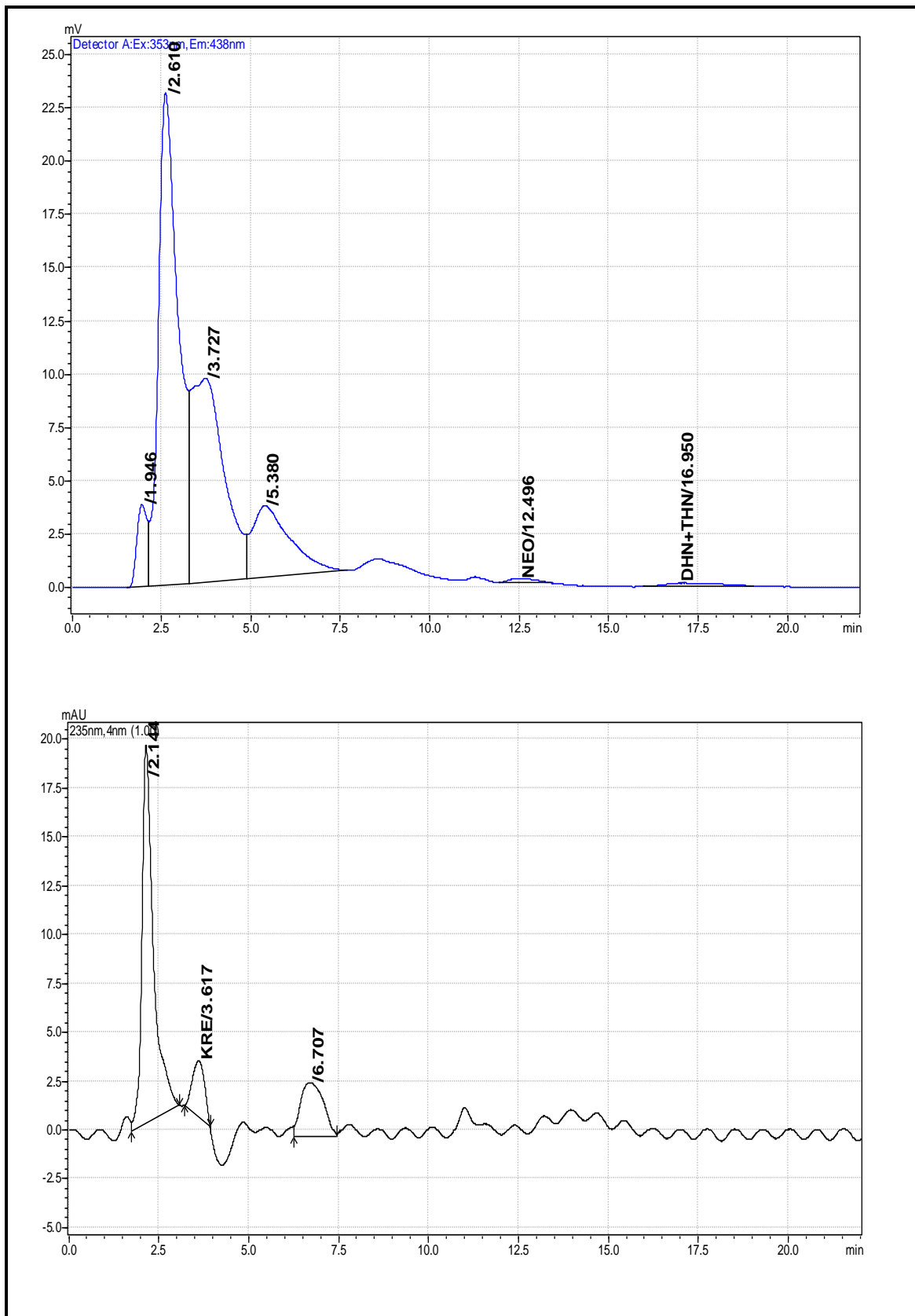
Obr. 23.: Analýza vzorku moči prvního pacienta



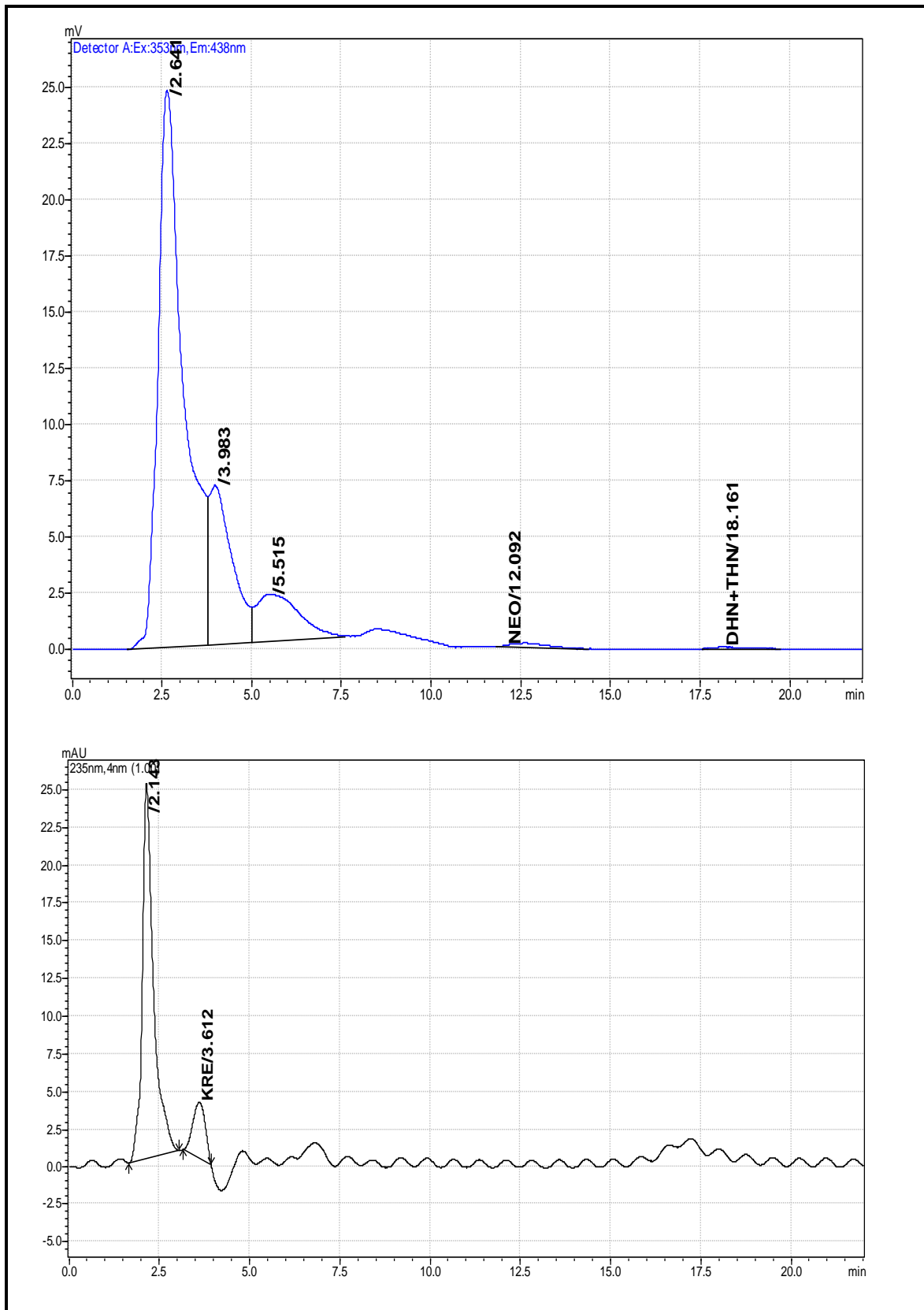
Obr. 24.: Analýza vzorku moči druhého pacienta



Obr. 25.: Analýza vzorku moči třetího pacienta



Obr. 26.: Analýza vzorku moči čtvrtého pacienta



Obr. 27.: Analýza vzorku moči pátého pacienta

Byly srovnány koncentrace neopterinu zjištěné touto metodou s koncentracemi neopterinu ve stejných biologických vzorcích zjištěné metodou vyvinutou ve Fakultní nemocnici Hradec Králové, umožňující kvantifikovat pouze neopterin.

Tab. 23.: Změřené koncentrace neopterinu, biopterinu a dihydroneopterinu + tetrahydroneopterinu a srovnání s koncentrací neopterinu naměřenou ve stejných biologických vzorcích ve Fakultní nemocnici

Pacient	Konc. neopterinu změřená Fakult. nemocnicí (nmol/l)	Konc. neopterinu (nmol/l)	Konc. biopterinu (nmol/l)	Konc. dihydroneopterinu + tetrahydroneopterinu (nmol/l)
1	979	1073	7662	-
2	902	775	2536	-
3	3124	3570	7647	5014
4	1298	682	-	5063
5	440	598	-	5263

Z Tab. 23. je patrné, že koncentrace neopterinu změřené oběma metodami jsou řádově stejné.

Metoda je neselektivní pro biopterin, při vlastní analýze s ním interferují balastní látky z biologického vzorku. Vzorky byly předem odstředěny podle metody Fakultní nemocnice Hradec Králové a pak naředěny 100 krát používanou mobilní fází přímo před analýzou. Tato metoda přípravy vzorku je nedostatečná, lepších výsledků by mohlo být dosaženo použitím extrakce na pevnou fázi nebo extrakce do organického rozpouštědla.

6. ZÁVĚR

1. Byla vyvinuta metoda pro současné stanovení biopterinu, dihydroneopterinu, tetrahydroneopterinu, neopterinu a kreatininu za použití metody HPLC s fluorescenční detekcí.
2. Na základě rešerže byl určen způsob detekce zkoumaných látek: $\lambda = 235$ nm pro kreatinin, $\lambda_{\text{exc}} = 353$ nm a $\lambda_{\text{emis}} = 438$ nm pro pteridiny.
3. Byly testovány celkem čtyři analytické kolony za různých chromatografických podmínek; jedna kolona pro metodu HILIC a tři kolony určené pro separaci polárních látek. V rámci tohoto testování bylo také zkoumáno retenční chování neopterinu a kreatininu v systému HILIC: druh vodné složky mobilní fáze více ovlivňoval retenci u kreatininu, u neopterinu byl průběh závislosti retenčních časů na koncentraci různých vodných složek mobilní fáze podobný.
4. Byla vybrána analytická kolona a nalezena optimální mobilní fáze pro separaci zkoumaných látek. Při těchto podmínkách byl prováděn test způsobilosti systému, ověření linearity a stanovení látek v biologických vzorcích. Konkrétně se jednalo o analytickou kolonu ZIC – HILIC. Mobilní fáze byla složena z acetonitrilu a 0,5% kyseliny octové zastoupených v poměru 87 : 13. Za daných podmínek se podařilo dosáhnout tří píků na fluorescenčním detektoru odpovídající pteridinům a jednoho píku na UV detektoru odpovídající kreatininu. Nepodařilo se však oddělit od sebe dihydroneopterin a tetrahydroneopterin. Pro jejich oddělení by byla zapotřebí chromatografická kolona s vyšší separační účinností (separační účinnost použité ZIC – HILIC kolony byla velmi nízká). Analýza trvala 25 minut.
5. Při testování způsobilosti systému byla zjištěna tato data:
 - Požadavek na počet teoretických pater ($N > 900$) byl splněn pouze pro kreatinin. Použitá ZIC – HILIC kolona vykazovala celkově velmi nízkou separační účinnost.
 - Požadavek na asymetrii chromatografických píků ($A_S < 2,0$) byl u všech látek splněn.
 - Požadavek na rozlišení chromatografických píků ($R_S > 1,5$) byl u látek zobrazovaných na fluorescenčním detektoru splněn.

- Podmínku opakovatelnosti plochy píku ($RSD < 1\%$) splňoval pouze neopterin. Zde se bohužel nepodařilo dosáhnout lepších výsledků. Vliv může mít stabilita, malá separační účinnost kolony, tvar píku.
- Podmínky pro opakovatelnost pro retenční čas ($RSD < 1\%$) splňovaly biopterin a neopterin.
- S kreatininem byl problém jak při opakovatelnosti plochy píku, tak při opakovatelnosti pro retenční čas, nepodařilo se prozatím zjistit důvod. Při použitých chromatografických podmínkách měl nereprodukovatelný retenční čas. Také u dihydroneopterinu + tetrahydroneopterinu byla velká chyba při testu opakovatelnosti. Bylo to dáno tím, že se jedná o sumu dvou píků, které se nepodařilo rozdělit. Východiskem by mohla být výměna stávající kolony za kolonu s lepší separační účinností. Relativně nízká účinnost používané kolony způsobovala rozmyté píky, což mělo negativní vliv na reprodukovatelnost. Z hlediska retence však kolona ZIC – HILIC vykazovala vynikající vlastnosti.

6. Dále byly testovány linearita a rozmezí kalibrace:

- Linearita metody byla testována v rozmezí koncentrací 10 – 1000 nmol/l pro pteridiny a 0,1 – 10 $\mu\text{mol/l}$ pro kreatinin. Kalibrační křivky biopterinu, neopterinu, s výhradou pro směs dihydroneopterinu + tetrahydroneopterinu, byly v daném rozmezí koncentrací lineární. Korelační koeficienty pro biopterin a neopterin byly vyšší než 0,999. Korelační koeficient pro sumu dihydroneopterinu + tetrahydroneopterinu byl vyšší než 0,99. Kalibrační křivka kreatininu nebyla lineární, podmínky, za kterých byla prováděna kalibrace, nebyly vhodné pro kvantifikaci kreatininu. Jeho chování v tomto chromatografickém systému bylo nereprodukovatelné. Příčinu se prozatím nepodařilo zjistit.

7. Odstředěné vzorky moči byly před vlastním stanovením naředěny 100 krát mobilní fází a byla na ně aplikována vyvinutá metody. Získané výsledky o koncentraci zkoumaných látek byly porovnány s výsledky získanými v nemocnici. Koncentrace neopterinu byla řádově shodná. Vyvinutá metoda byla neselektivní pro biopterin, při vlastní analýze s ním interferovaly balastní látky z biologického vzorku. Metoda přípravy vzorku jeho pouhým naředěním

mobilní fázi byla nedostačující, lepších výsledků by mohlo být dosaženo použitím extrakce na pevnou fázi nebo extrakce do organického rozpouštědla.

U vyvinuté metody nebylo dosaženo požadované účinnosti pro separaci dihydroneopterinu a tetrahydroneopterinu, které při analýzách tvořily společný pík. Bylo by třeba zvolit kolonu s vyšší separační účinností, separační účinnost použité kolony byla celkově nízká. Kreatinin se v systému za daných podmínek choval zcela nereprodukovatelně. Pro jeho analýzu by bylo zapotřebí zvolit zcela jiný přístup než ke zbylým látkám. Vyvinutá metoda nebyla selektivní ani pro stanovení biopterinu v biologických vzorcích, kde s ním interferovaly balastní látky. Metoda přípravy biologického vzorku pro analýzu by měla být důkladnější. Vyvinutá metoda umožňuje spolehlivě pouze stanovení neopterinu.

7. LITERATURA

- [1] J. Tomandl, Chem. listy, 92 (1998) 689.
- [2] D. E. Metzler, The Chemical Reactions of Living Cells, Volume 1, USA, Harcourt / academic press, 2001
- [3] B. Hofmann et al., Clin. exp. Immunol., 88 (1992) 548.
- [4] Wilmer et al., Gut, 37 (1995) 108.
- [5] D. Voet, J. Voetová, Biochemie, Praha, Victoria Publishing, a. s., 1995
- [6] D. Solichová a kol., Stanovení neopterinu v moči u gerontologických pacientů, Česká geriatrická revue 2/2003 6 – 12
- [7] http://www.podhorska.cz/obsah/oddeleni/okbh_bruntal/downloads/lab/kreatinin.pdf – 11. 1. 2009
- [8] T. M. Devlin, Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, Third edition, Wiley – Liss, Inc., USA, 1992
- [9] D. E. Metzler, Biochemistry – The Chemical Reactions of Living Cells, Volume 2, Elsevier Science, USA, 2003
- [10] http://www.imuno.cz/vysetreni_detail.php?ID=117 – 11. 1. 2009
- [11] J. Klimeš a kol., Kontrola léčiv I., Praha, Karolinum, 2006
- [12] P. Klouda, Moderní analytické metody, Ostrava, Pavel Klouda, 2003
- [13] J. Churáček a kol., Analýza organických látek, Český Těšín, 2 THETA, 1999
- [14] P. Hemström, K. Irgum, J. Sep. Sci., 29 (2006) 1784.
- [15] A Practical Guide to HILIC, Umea, Sweden, SeQuant AB, 2005
- [16] http://www.hichrom.com/assets/Cat_Pdfs_for_SO/Sequant_p175-176.pdf – 9. 11. 2008
- [17] <http://www.sequant.com/default.asp?ml=11528> – 9. 11. 2008
- [18] <http://www.nestgrp.com/pdf/Zp1/zh.colcare/zicnopm.pdf> – 9. 11. 2008
- [19] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SUPELCO/58997> – 9. 11. 2008
- [20] <http://www.zirchrom.com/History.asp> – 9. 11. 2008
- [21] <http://www.zirchrom.com/Intro.asp> – 9. 11. 2008
- [22] Supelco Discovery HPLC Columns, Rediscover Method Development, USA, Sigma – Aldrich Co., 2003
- [23] http://www.chemagazin.cz/Texty/CHXIII_3_cl12.pdf - 8. 11. 2008
- [24] J. Klimeš a kol., Kontrola léčiv II., Praha, Karolinum, 2004
- [25] Český lékopis 2005 1. díl, Praha, Grada, 2002
- [26] M. Porcar et al., J. Chromatogr. A, 724 (1996) 193.

- [27] M. Hibiya et al., *J. Chromatogr. B*, 691 (1997) 223.
- [28] C. Carru et al., *Biomed. Chromatogr.*, 18 (2004) 360.
- [29] E. R. Werner et al., *Clin. Chem.*, 33/11 (1987) 2028.
- [30] D. Solichová et al., *Talanta*, 60 (2003) 459.
- [31] J. Whitsett et al., *Free Rad. Biol. Med.*, 40 (2006) 2056.
- [32] D. Fekkes, A. Voskuilen – Kooijman, *Clin. Biochem.*, 40 (2007) 411.
- [33] T. Smith – Palmer, *J. Chromatogr. B*, 781 (2002) 93.
- [34] N. Turgan et al., *Clin. Biochem.*, 33 (2001) 271.
- [35] S. K. George et al., *J. Chromatogr. B*, 832 (2006) 134.
- [36] A. K. Dash, A. Sawhney, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 29 (2002) 939.
- [37] J.-F. Jen, S.-L. Hsiao, K.-H. Liu, *Talanta* 58 (2002) 711.
- [38] T. Fujii et al., *J. Chromatogr. B*, 730 (1999) 41.
- [39] I. D. Merás, A. E. Mansilla, M. J. R. Gómez, *Anal. Biochem.*, 346 (2005) 201.
- [40] B. Widner et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 248 (1998) 341.
- [41] E. A. Flavall et al., *J. Chromatogr. B*, 863 (2008) 167.
- [42] Y. – I. Yoshida, S. Eda, M. Masada, *Brain & Development*, 22 (2000) S45.
- [43] H. Rokos, W. D. Beazley, K. U. Schallreuter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 292 (2002) 805.
- [44] P. Tůma, E. Samcová, K. Andělová, *J. Chromatogr. B*, 839 (2006) 12.
- [45] A. Radomska et al., *Talanta*, 64 (2004) 603.
- [46] T. Kuhara, *J. Chromatogr. B*, 758 (2001) 3.
- [47] E. Pobozy et al., *J. Chromatogr. B*, 789 (2003) 417.