

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie

**Hodnocení vlastností nových HILIC stacionárních fází pro analyty
ze skupiny pteridinů s využitím metodiky UHPLC-FD**

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

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

Hradec Králové 2011

Iva Kaufmannová

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Iva Kaufmannová

Školitel: PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Název diplomové práce: Hodnocení vlastností nových HILIC stacionárních fází pro analyty ze skupiny pteridinů s využitím metodiky UHPLC-FD

Předmětem této diplomové práce je hodnocení vlastností tří typů nových HILIC stacionárních fází určených k identifikaci a stanovení biologicky aktivních látek biopterinu, neopterinu, dihydrobiopterinu a dihydroneopterinu za použití metody UHPLC ve spojení s fluorescenční detekcí.

Neopterin slouží jako ukazatel aktivace imunitního systému a zánětlivých onemocnění. Jeho včasná detekce v moči nebo plazmě může pomoci odhalit patologickou imunitní aktivitu. Se zvýšenou hladinou neopterinu se setkáváme u virových či bakteriálních onemocnění, u autoimunitních nemocí, při HIV infekci či u zhoubných nádorů. 7,8 - dihydroneopterin je schopen bránit proteiny a lipoproteiny před oxidačním poškozením.

HILIC je chromatografickou metodou, kterou lze použít ke zvýšení retence velmi polárních sloučenin. Využívá polární stacionární fáze a mobilní fáze obsahující určité množství vody a polárního rozpouštědla. UHPLC je nejmodernější technologií umožňující vyvinout tlak okolo 100 MPa. Používá kolony s malými částicemi (< 2 μm), které přispívají ke zlepšení separační účinnosti a rozlišení.

Celkem byly testovány tři chromatografické kolony (BEH AMIDE, BEH GLYCAN, BEH HILIC) za různých podmínek, za kterých byla měněna hodnota pH, koncentrace a procentuální obsah vodné složky mobilní fáze. Kolona BEH HILIC neposkytovala za žádných podmínek dostatečnou retenci a selektivitu pro separaci všech čtyř pteridinů. Naopak tomu bylo u kolony BEH AMIDE, která vykazovala silnou retenci pro všechny analyzované látky, a to zejména při vysokých hodnotách pH (9,8). Nicméně při takto vysokém pH byla výrazně snížena selektivita separace pro páry neopterin – dihydroneopterin a biopterin – dihydrobiopterin, což vedlo k nežádoucí velmi dlouhé době analýzy. Nejlepší separace všech čtyř pteridinů, a zároveň dobré retence (do osmi minut), bylo dosaženo pomocí 50mM octanu amonného při pH v rozmezí 4,8 - 7,8.

Klíčová slova:

HILIC, UHPLC-FD, biopterin, neopterin, dihydrobiopterin, dihydroneopterin, 5,6,7,8 - tetrahydrobiopterin, BEH AMIDE, BEH GLYCAN, BEH HILIC

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of analytical chemistry

Candidate: Iva Kaufmannová

Supervisor: PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Title of Doctoral Thesis: Evaluation of properties of new HILIC stationary phases for pteridins using UHPLC-FD method

The subject of this thesis was to evaluate the characteristics of three new types of HILIC stationary phases for the identification and quantification of biologically active substances biopterin, neopterin, dihydrobiopterin and dihydroneopterin by UHPLC with fluorescence detection.

Neopterin is used as a marker of immune system activation and inflammatory diseases. Its early detection in urine or plasma may indicate a pathological immune activity. Elevated concentration of neopterin is described in viral or bacterial diseases, in autoimmune diseases in HIV infection or in malignant tumors. 7,8 - dihydroneopterin is able to prevent proteins and lipoproteins from oxidative damage.

Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) is a chromatographic method that can be used to improve retention of very polar compounds. It uses a polar stationary phase and mobile phase containing a certain amount of water and polar solvents. UHPLC is the most advanced separation technology to develop a pressure of about 100 MPa. It uses columns with small particles (< 2 µm), which contribute to the improvement of the separation efficiency and resolution.

Overall the three chromatographic columns were tested (BEH AMIDE, BEH GLYCAN, BEH HILIC) at different chromatographic conditions, where the pH and the concentration and the percentage of aqueous content of mobile phase components were changed. BEH HILIC did not provide sufficient retention and selectivity for the separation of four pteridines under any tested conditions. Conversely BEH AMIDE provided a strong retention for all analytes, especially at high pH values (9.8). However, at this high pH the selectivity of separation for the pairs neopterin – dihydroneopterin and biopterin – dihydrobiopterin was significantly reduced, leading to very long analysis time. The best separation of all four pteridines, lasting up to eight minutes, was achieved with 50mM ammonium acetate buffer at pH range 4.8 - 7.8.

Keywords:

HILIC, UHPLC-FD, biopterin, neopterin, dihydrobiopterin, dihydroneopterin, 5,6,7,8 - tetrahydrobiopterin, BEH AMIDE, BEH GLYCAN, BEH HILIC

Největší poděkování patří mé školitelce PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícné jednání, užitečné rady, za pomoc a za její čas, který mi věnovala během utváření mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům Katedry analytické chemie za poskytnutí laboratoře, vřelé přijetí a za to, že mi byly v případě potřeby nápomocni. V neposlední řadě děkuji mé rodině, která při mně po celou dobu stála a podporovala mě.

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

V Dolních Libchavách 6. 5. 2011

.....
Iva Kaufmannová

OBSAH

OBSAH.....	6
SEZNAM ZKRATEK	9
1. ÚVOD.....	10
2. CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE.....	12
3. TEORETICKÁ ČÁST	14
3.1 PTERIDINY	15
3.1.1 Chemická struktura a rozdělení	15
3.1.2 Fyzikálně - chemické vlastnosti.....	16
3.1.3 Biosyntéza pteridinů	17
3.1.4 Regulace biosyntézy pteridinů.....	18
3.1.5 Význam a funkce zkoumaných pteridinů	19
3.1.6 Metody stanovení pteridinů	20
3.1.7 Přehled publikovaných metod pro stanovení pteridinů	20
3.2 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE	23
3.2.1 Technologický pokrok v kapalinové chromatografii.....	24
3.2.2 Technika UHPLC	24
3.2.3 NP-HPLC, RP-HPLC	30
3.2.4 Chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC).....	31
3.3 VALIDACE ANALYTICKÉ METODY	34
3.3.1 Test způsobilosti systému	34
3.3.2 Validace metody	36
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
4.1 MATERIÁLY A POMŮCKY	39
4.1.1 Přístrojové vybavení	39
4.1.2 Chemikálie	39
4.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ	40
4.2.1 Příprava zásobních roztoků.....	40

4.2.2	Příprava pracovních roztoků.....	40
4.2.3	Příprava vodných složek mobilní fáze.....	41
4.3	OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK.....	43
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	44
5.1	VÝVOJ HILIC METODY PRO SEPARACI.....	45
5.1.1	Chromatografická kolona BEH AMIDE.....	48
5.1.2	Chromatografická kolona BEH HILIC.....	54
5.1.3	Chromatografická kolona BEH GLYCAN.....	59
5.1.4	Hodnocení zpětného tlaku v chromatografickém systému.....	65
5.2	ZVÝŠENÍ STABILITY REDUKOVANÝCH FOREM PTERIDINŮ.....	67
5.2.1	Zvýšení stability působením dithiothreitolu (DTT).....	67
5.2.2	Zvýšení stability působením kyseliny askorbové (AA).....	70
5.3	VALIDACE METODY HILIC.....	73
5.3.1	Chromatografická kolona BEH AMIDE.....	74
5.3.2	Chromatografická kolona BEH GLYCAN.....	80
6.	ZÁVĚR.....	82
7.	POUŽITÁ LITERATURA.....	86
8.	PŘÍLOHA.....	90

SEZNAM ZKRATEK

8-OH-G	8 - hydroxyguanine
AA	Ascorbic acid; kyselina askorbová
AcAc	Acetic acid; kyselina octová
ACN	Acetonitril
AmAc	Ammonium acetate; octan amonný
BEH	Bridged ethyl hybrid; hybridní stacionární fáze
BH2	7,8 - dihydrobiopterin
BH4	5,6,7,8 - tetrahydrobiopterin
BIO	Biopterin
CSF	Cerebrospinal fluid; mozkomíšní mok
DTT	Dithiothreitol
GTP	Guanosintrifosfát
HILIC	Hydrophilic interaction liquid chromatography; chromatografie hydrofilních interakcí
HIV	Human Immunodeficiency Virus; virus u člověka způsobující ztrátu obranyschopnosti
HPLC	High performance liquid chromatography; vysokoúčinná kapalinová chromatografie
INF- γ	Interferon - gama
MP	Mobile phase; mobilní fáze
MS	Mass Spectrometry; hmotnostní spektrometrie
NEO	Neopterin
NH2	7,8 - dihydroneopterin
NP-HPLC	Chromatografie na normálních fázích
PTPS	6-pyruvoyltetrahydropterinsynthasa
RP-HPLC	Chromatografie na obrácených fázích
SST	System suitability test; test způsobilosti systému
TCA	Trichloroacetic acid; trichloroctová kyselina
TNF- α	Tumor nekrotizující faktor α
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography; ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	Ultraviolet; ultrafialová oblast

1. ÚVOD

Metoda *chromatografie hydrofilních interakcí* (HILIC) se teprve nedávno stala populární pro separaci biologicky aktivních látek, které jsou pro svoji polární strukturu pomocí ostatních separačních přístupů obtížně analyzovatelné. HILIC je alternativou konvenční RP-HPLC či NP-HPLC pro analýzu malých polárních molekul. Rozdíl je v tom, že metoda HILIC používá polární stacionární fázi a organické rozpouštědlo (většinou ACN > 70%) s určitým obsahem vody (nejméně 2,5%) jako fázi mobilní. Vymývání polárních látek je umožněno zvýšením polaroty mobilní fáze, čili zvýšením obsahu vody. Z toho vyplývá, že retenční pořadí eluovaných analytů bude ve srovnání s RP-HPLC opačné. Analyty budou vymývány v pořadí rostoucí hydrofility. Metoda HILIC nabývá stále většího významu. Dnes nachází uplatnění například v analýze antibiotik, toxinů, cytostatik, metabolitů, sacharidů, saponinů, peptidů, aminokyselin, bílkovin či glykanů.

V roce 2004 došlo v oblasti vysokoúčinné kapalinové chromatografie k velkému pokroku v technologii kolon a přístrojového vybavení, které přispěly k dosažení velmi výrazného zvýšení rozlišení, rychlosti a citlivosti. Tato metoda dostala název *ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie* (UHPLC) a byla použita v této diplomové práci k popisu retenčních vlastností zkoumaných pteridinů v systému HILIC, který byl zvolen právě díky polární struktuře pteridinů.

2. CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE

Tato diplomová práce se zabývá hodnocením nových HILIC stacionárních fází pro analýzu biologicky aktivních látek biopterinu, neopterinu, 7,8 – dihydrobiopterinu a 7,8 – dihydroneopterinu pomocí UHPLC s fluorescenční detekcí.

Primárním cílem bylo pomocí HILIC metody ověřit retenční chování zmíněných pteridinů na předem zvolených kolonách a určit chromatografické podmínky, za kterých by docházelo k nejlepší separaci jednotlivých derivátů. V rámci optimalizace chromatografických podmínek byly testovány celkem tři analytické HILIC kolony (BEH AMIDE, BEH HILIC a BEH GLYKAN), u kterých bylo zkoumáno retenční chování jednotlivých pteridinů v závislosti na poměru organické a vodné složky mobilní fáze, na vlivu přidaných přísad do mobilní fáze, molaritě a pH. Po nalezení optimálních chromatografických podmínek pro analýzu směsi standardů následoval test způsobilosti systému, ověření linearitě a citlivosti pro jednotlivé látky. Dále byla zkoumána stabilita redukovaných forem pteridinů (BH₂, NH₂), které i přes správné zacházení se vzorky podléhaly během analýzy oxidaci. Přidání dithiothreitolu či kyseliny askorbové (za účelem zvýšení stability) však problém kompletně nevyřešilo.

3. TEORETICKÁ ČÁST

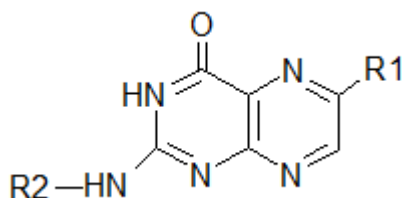
3.1 PTERIDINY

První záznam o pteridinech byl dochován z roku 1889, kdy pan Hopkins izoloval žlutý pigment z křídel lepidoptera [1]. Právě podle řeckého slova pteron (= křídlo) byl odvozen název pro celou skupinu těchto pigmentů [2].

Nejvyšší koncentrace pteridinů byly nalezeny u hmyzu, obojživelníků, ryb a plazů v podobě pigmentů [3]. Savci si umí sami syntetizovat pouze nekonjugované pteridiny, zatímco konjugované syntetizovat neumí [4]. U člověka byly pteridiny zkoumány v moči [5], plazmě [6], mozkomíšním moku [7] a ascitu [8]. Poměrně vysoké koncentrace byly nalezeny zejména v moči, kde šlo především o biopterin a neopterin. Pteridinů existuje široké množství. Biologická funkce však nebyla popsána u všech zástupců [2].

3.1.1 Chemická struktura a rozdělení

Základní strukturou těchto látek je pteridin, který byl odvozen od pyrazino-[2,3-d]-pyrimidinového bicyckického systému. Podle substituce pyrimidinového cyklu se deriváty pteridinu dělí na *pteriny* (obrázek 1), což jsou deriváty 2-amino-4-oxo-3,4-dihydropteridinu a na *lumaziny*, což jsou deriváty 2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropteridinu [2].



Obrázek 1: Strukturální vzorec pteridinů v oxidované formě

Podle velikosti substituentů lze deriváty pteridinu rozdělit na *nekonjugované*, které obsahují relativně malé substituenty (např. biopterin, neopterin, molybdopterin) a *konjugované*, které obsahují větší substituenty (např. riboflavin, kyselina listová) [9].

Další možností dělení těchto látek je podle postranního řetězce v poloze 6 či podle oxidačního stavu pteridinového cyklu. V tabulce 1 je uveden přehled hlavních pteridinů, které byly detekovány u člověka [2].

Sloučenina	R 1	R2
Pterin	H	H
Xanthopterin	OH	H
6-Formylpterin	CHO	H
6-Karboxypterin	COOH	H
6-Hydroxymethylpterin	CH ₂ OH	H
Sepiapterin	(2'S)-CO-CHOH-CH ₃	H
Biopterin	(1'R,2'S)-CHOH-CHOH-CH ₃	H
Orinapterin	(1'S,2'S)-CHOH-CHOH-CH ₃	H
Onkopterin	(1'R,2'S)-CHOH-CHOH-CH ₃	CH ₂ - CH ₂ - CH ₂ -NH ₂
Neopterin	(1'S,2'R)-CHOH-CHOH-CH ₂ OH	H
Monapterin	(1'S,2'S)-CHOH-CHOH-CH ₂ OH	H
Umanopterin	(1'R,2'R)-CHOH-CHOH-CH ₂ OH	H
Molybdopterin	CSH=CSH-CHOH-CH ₂ O-PO ₃ ²⁻	H

Tabulka 1: Přehled hlavních pteridinů zjištěných u člověka [2]

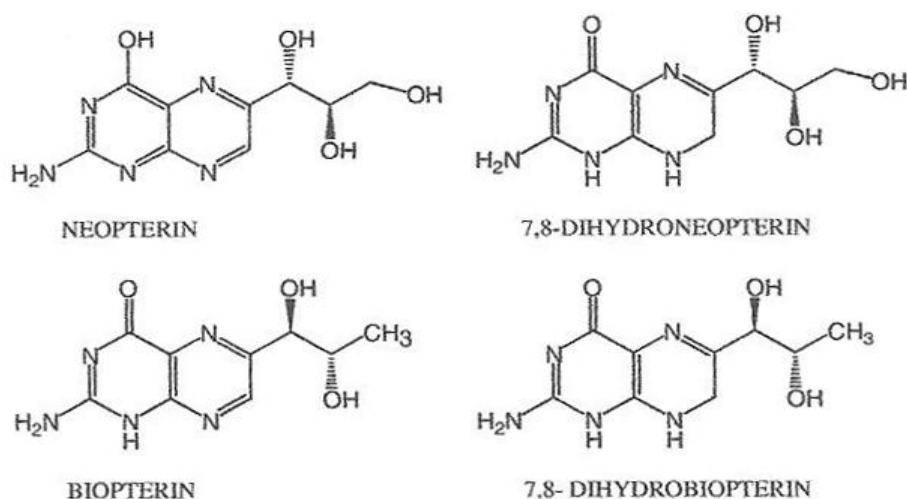
3.1.2 Fyzikálně - chemické vlastnosti

Analýza pteridinů je poměrně složitá v důsledku jejich chemických vlastností. V biologických tekutinách se nacházejí v celkem nízkých koncentracích, které se špatně detekují [2].

Pteridiny jsou fotosenzitivní sloučeniny, které jsou působením světla přeměňovány na příslušné redukované formy [10]. Proto je důležité dbát na vhodné zacházení se vzorky. Například by měly být ukládány na tmavých místech a neměly by být vystavovány velkým teplotním změnám. Nejvhodnější je příprava do tmavých vialek a ukládání do lednice či mrazáku. BIO a NEO jsou v porovnání s BH₂ a NH₂ ve vodě obtížněji rozpustné. Při analýze lze jako stabilizátory pteridinů použít antioxidanty (např. kyselinu askorbovou či dithiothreitol) [11][12].

Pteridiny se vyskytují ve třech oxidačních formách: v 7,8-dihydro-, 5,6,7,8-tetrahydro- a plně oxidované (aromatické) formě. Redukované formy snadno podléhají oxidaci vzdušným kyslíkem a mají velmi silné antioxidační účinky. Proto mohou in vivo působit jako lapače reaktivních forem kyslíku [13].

Jednou z velmi důležitých vlastností pro analýzu je, že pouze oxidované formy pteridinů vykazují silnou modrou fluorescenci [10]. Biopterin, neopterin a jejich deriváty mají podobná UV spektra [14]. Strukturální vzorce pteridinů zkoumaných v této práci jsou znázorněny na obrázku 2.

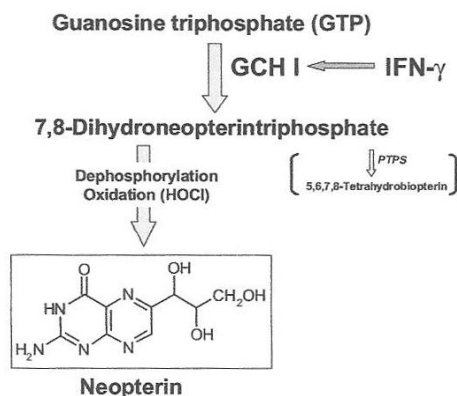


Obrázek 2: Vzorce pteridinů zkoumaných v této práci

3.1.3 Biosyntéza pteridinů

Nejlépe je prozkoumána biosyntéza tetrahydrobiopterinu a neopterinu. Neopterin je syntetizován z guanosintrifosfátu (GTP) pomocí GTP cyklohydrolázy I. GTP je převeden na 7,8-dihydroneopterintrifosfát. Pokud dále působí 6-pyruvoyltetrahydropterinsynthasa (PTPS) vzniká BH₄. V lidských monocitech/makrofázích však chybí aktivita PTPS. V důsledku toho dochází k defosforylaci a oxidaci 7,8-dihydroneopterintrifosfátu a vzniká neopterin (obrázek 3) [2][15].

Zvýšené biosyntézy neopterinu v monocitech/makrofázích bylo dosaženo po aktivaci cytokiny, zejména INF- γ [10]. Větší produkce neopterinu ze 7,8-dihydroneopterintrifosfátu probíhá na úkor vzniku BH₄, což vysvětluje, proč nemoci způsobené nedostatkem BH₄ jsou identifikovatelné pomocí zvýšené hladiny neopterinu [8]. Biosyntéza jednotlivých pteridinů je znázorněna na obrázku 4 [16].



Obrázek 3: Vznik neopterinu [8]

3.1.5 Význam a funkce zkoumaných pteridinů

Biopterin a 7,8 - dihydrobiopterin

Jsou to oxidační produkty tetrahydrobiopterinu. Nedostatečná syntéza může způsobit poškození v biosyntéze monoaminových neurotransmiterů [17]. Biopterin také stimuluje mitosu u trypanosomy *Crithidia flagellata* [18]. Vysoké procento biopterinu se nachází například v mateřském mléce [11].

5,6,7,8 - tetrahydrobiopterin

Slouží jako kofaktor fenylalanin-4-monooxygenasy, tyrosin-3-monooxygenasy, tryptofan-5-monooxygenasy, alkylglykol-ether-monooxygenasy a NO-synthasy [4]. Dále ovlivňuje některé mechanismy na neuronech [15]. Je nepostradatelný při biosyntéze neurotransmiterů, jako jsou dopamin, noradrenalin a serotonin [16]. Právě snížená koncentrace BH4 způsobuje několik neurologických onemocnění, mezi které patří například Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba, autismus, úzkost či deprese [15].

Vzhledem ke své funkci jako kofaktor NO-synthasy byl zkoumán u kardiovaskulárních onemocnění provázených endotelovou dysfunkcí [6]. V cévách je deficit BH4 zapojený do mechanismů několika chorob, mezi které patří například ateroskleróza, hypertenze, diabetická cévní choroba a cévní komplikace z kouření cigaret. Tyto choroby jsou způsobeny schopností BH4 regulovat množství reaktivních kyslíkových látek v endotelu. Také proto se možnost využít BH4 jako léčebný prostředek u kardiovaskulárních onemocnění zdá být stále více přesvědčivá. V dnešní době se tímto návrhem zabývá mnoho studií [19]. BH4 hraje také důležitou roli u léčby fenylketonurie, u které se můžeme setkat buď s deficitem v biosyntéze BH4, nebo s nedostatečnou citlivostí fenylalanin hydroxylasy [6][20].

Neopterin

Slouží jako ukazatel aktivace imunitního systému a zánětlivých onemocnění. Je produkován makrofágy, které jsou stimulovány interferonem- γ a TNF- α . Tyto dva cytokiny jsou považovány za klíčové spouštěče imunologicky vyvolaného zvýšení koncentrace NEO. Měřením hladiny NEO v moči nebo plazmě lze včas odhalit patologickou imunitní aktivitu. Se zvýšenou koncentrací neopterinu se setkáváme například u virových, bakteriálních, autoimunitních (např. lupus erythematosus, revmatoidní artritida, atopické astma) či kardiovaskulárních onemocnění, při rejekčních

reakcích transplantované tkáně, inzulínové rezistenci, u určitých typů malignit (např. leukémie, lymfom), u zhoubných nádorů (např. mnohočetný myelom, rakovina vaječnicků, tlustého střeva nebo plic) či u psychických poruch [8][21][22]. Neopterin také sehrál velmi důležitou roli ve výzkumu HIV infekce. Jeho zvýšené hladiny jako první signalizovaly imunitní aktivaci HIV patogeneze. Navzdory tomu, že jsou již v dnešní době dostupné dostatečně citlivé konkrétní HIV 1 ukazatelé, stanovení koncentrace neopterinu v krvi či moči pacientů zůstává stále užitečná pro svou jednoduchost a nízké náklady [23].

7,8 - dihydroneopterin

Je redukovanou formou neopterinu. Chová se jako silný antioxidant, u něhož bylo *in vitro* dokázáno, že je schopen bránit proteiny a lipoproteiny před oxidačním poškozením [12]. Také je schopen aktivovat transkripční faktory, a tím indukovat expresi HIV-1 genu [24].

3.1.6 Metody stanovení pteridinů

Pteridiny se nejčastěji stanovují v moči, séru, plazmě a mozkomíšním moku. Hodnoty koncentrací se pohybují okolo 10^{-9} - 10^{-6} mol/l. Otázka stability těchto vzorků však stále zůstává neprozkoumána. Po technické stránce převládají metody chromatografické. Doposud byly pteridiny nejlépe stanoveny pomocí HPLC s následnou fluorescenční nebo elektrochemickou detekcí [2]. Mezi další metody patří: fluorimetrie [25], radioimunolýza [26], ELISA [27], imunoanalýza, detekce pomocí enzymů fenylalanin-4-monooxygenasy nebo dihydropterin-reduktasy [28 - 29].

3.1.7 Přehled publikovaných metod pro stanovení pteridinů

V tabulce 2 a 3 je uveden přehled nedávno publikovaných metod pro stanovení pteridinů. Většina studií využila metody reverzně-fázové vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí o excitační vlnové délce 355 nm a emisní vlnové délce 450 nm. Mobilní fáze byla nejčastěji složena z 5 - 150 mM fosfátového pufru o pH 2,3 - 6,7. Pro retenci byl důležitý vysoký procentuální obsah vodné složky mobilní fáze. Objem nástřiku vzorku byl volen podle typu kolony v mezích 20 - 250 μ l. Průtok mobilní fáze kolonou se pohyboval v rozmezí 0,4 - 1 ml/min. Pteridiny jsou stanovovány z biologických materiálů. Jedná se zejména o moč, plazmu či mozkomíšní mok.

Látka	Zdroj	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Průtok	Nástřík	Detekce	Příprava vzorku	Cítace
BH4	Plazma	ODS-1 Spherisorb (250 × 4,6 mm, 5 μm) Předkolona: C8 Spherisorb (40 × 4,6 mm, 5 μm)	Hydrogenfosfátový pufr (1,5 mmol/l, pH 4,6) 8% MeOH (v/v)	1,2 ml/min	20 μl	FD (350nm/450nm)	Plazma 2,7 ml EDTA 0,1% DTT (w/v) 0,04% AA (w/v)	[6]
BIO NEO	Mozko- míšní mok	1) Nucleosil C-18 (250 × 5mm, 5 μm) 2) ODS Teknochroma (20 × 4 mm)	1 μmol/l KH ₂ PO ₄ /methanol (91/9v/v)	1 ml/min	20 μl	FD (350nm/450nm)	200 μl CSF 20 μl 1 mol/l HCl 1 mg MnO ₂	[7]
BIO NEO	Moč	Nova-Pack C18 (150 × 3,9 mm, 5μm)	Tris-NaCl (15mM Tris, 1mM NaCl, HCl upraveno na pH 6,8)	1 ml/min	20 μl	UV (230 nm) FD (280nm/444 nm)	10μg/ml ultra čisté vody	[10]
NEO BIO BH2	Plazma	Zorbax Eclipse XBD-C18 (150 × 4,6 mm, 5 μm)	Směs 10mM pufru AA (pH 5,5) : ACN (99:1)	1 ml/min	20 μl	UV (256,272,330 nm) FD (272/435, 444nm)	ultra čistá voda 0,1% DTT	[11]
NEO NH2	Plazma	Develosil ODS-MG-5 (4,2 mm × 250 mm)	0,5% MeOH ve fosfátovém pufru (20mM, pH 6,0)	1 ml/min	10 μl	FD (353nm/438 nm)	a) 100 μl plazmy 10 μl 50% TCA 10 μl 0,6 mM AA b) 100 μl plazmy 100 μl 100% ACN	[12]
BIO NEO BH2 BH4	Moč	Zorbax Eclipse XBD-C18 (250 mm × 4,6 mm a 150 mm × 4,6 mm, 5 μm) Předkolona: XDB - C18 (12,5 mm × 4,6 mm)	Citrátový pufr (10 mM, pH 5,5) : ACN (99:1)	0,7 ml/min	20 μl	UV (256 nm) FD (272 m/445nm)	Pteridiny (90 μg/ml) 0,1% DDT ultračistá voda	[16]
NEO NH2	Moč	RP C18 (125 mm)	Fosfátový pufr (15 mmol/l, pH 6,4), Na ₂ -EDTA (2g/l)	1 ml/min	-	FD (353nm/438 nm)	100 μl moč 1000 ml 15 mmol/l fosforeč. pufru o pH 6,4	[30]

Tabulka 2: Přehled publikovaných metod pro stanovení pteridinů

(AA – kyselina askorbová, ACN – acetonitril, CSF – mozkomíšní mok, DTT – dithiothreitol, TCA - kyselina trichloroctová)

Látka	Zdroj	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Průtok	Nástřik	Detekce	Úprava vzorku	Citace
NEO	Moč Plazma	Diasfer C16 (100 × 4 mm, 5 μm) Předkolona : Phenomenex C18 (4 × 3 mm)	ACN : voda (1:99)	600 μl/min	20 μl	UV (350 nm) FD (350nm/430 nm)	100 ng/ml NEO 0,01 M NaOH	[31]
NEO BIO	Moč	HPLC-1: Iontově výměnná chrom. MCI GEL CA08F (7μm) HPLC-2: Capcell Pak C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm)	HPLC-1: 2% ACN v 0,3mM H ₂ SO ₄ HPLC-2: Fosfátový pufr (pH 6,7)	HPLC-1: 45 μl/min HPLC-2: 0,8 ml/min	20 μl	FD (353nm/438nm)	Moč 4% ACN 8-OH-G (120μg/ml) 130 mM NaOAc 0,6 mM H ₂ SO ₄	[32]
BIO BH4	Plazma	Hypersil C18 column (2,1 mm × 200 mm, 5 μm) Předkolona (2,1 × 20 mm)	Fosfátový pufr (15 mM, pH 6,45) + 10%, 100%, 0% MeOH	0,4 ml/min	10 μl	FD (360 nm/440 nm)	7,2 mg K ₂ -EDTA + 0,1 ml 1%, 2% nebo 4% DTT (w/v)	[33]
BIO NEO	Mozko- míšni mok	Ultra Pure Torsic Acid (5 μm)	4,6 g/l NH ₄ HPO ₄ (pH 3,5)	-	250 μl	FD (350 nm/450 nm)	0,2 ml CSF 0,1 ml 0,1M HCl 0,1 ml 0,2% I ₂ /0,4% KI 0,1 ml 1% AA	[34]
NEO	Moč	RP 18 Licrospher 100 (4 × 4 mm, 5 μm) Předkolona : Aquapore OD 300 (250 × 4,6mm,5μm)	150 mM fosforečnan sodný (pH 4,0)	0,8 ml/min	100 μl	UV (353, 360, 370 a 390 nm)	Přefiltrovaná moč	[35]
NEO	Moč Plazma	EC 150/4,6 Nucleosil 100 to 3 C18 3 mm	Fosfátový pufr (15 mmol/l, pH 6,4)	0,8 ml/min	20 μl	FD (353 nm/438 nm)	1) 10 μl moči + 990 μl MP s Na ₂ -EDTA (2g/l) 2) 500 μl plazmy + 500 μl 0,5 mol/l HClO ₄	[36]
BH4	Myší locus coeruleus	Develosil ODS-K-5 (150 × 4,6 mm)	50 mM fosforečnan amonný (pH 3,0)	1 ml/min	50μ l	FD (350 nm/450 nm)	+ 100 μl 0,2 M HCl/ 0,2 M NaOH + 10μl kyselého/alka- lického roztoku jódu	[37]

Tabulka 3: Přehled publikovaných metod pro stanovení pteridinů

(8-OH-G – 8 - hydroxyguanine, AA – kyselina askorbová, ACN – acetonitril, CSF – mozkomíšni mok, NaOAc – octan sodný)

3.2 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Chromatografie obecně je separační metoda, při které jsou oddělovány jednotlivé složky obsažené ve vzorku. V analýze je široce využívána zejména pro svou schopnost současného kvantitativního i kvalitativního hodnocení separovaných složek ve směsi, a to s vysokou citlivostí, selektivitou a v poměrně krátkém čase [38].

Základním principem chromatografie je nestejně rozdělování složek směsi mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze (stacionární a mobilní). Stacionární fáze je nepohyblivá, mobilní fáze je pohyblivá. Rozdílná afinita jednotlivých složek k fázím či jejich nestejná schopnost do nich difundovat je hlavním předpokladem nestejně rozdělování. Analýza probíhá tak, že mobilní fáze unášející s sebou zkoumanou směs se pohybuje přes stacionární fázi. Složky vzorku se mohou na stacionární fázi zachycovat, a tím pádem zpoždovat oproti složkám, které se na stacionární fázi neváží a dostávají se na konec stacionární fáze dříve. Tímto způsobem dochází k separaci [39].

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina, a proto o separaci složek směsi rozhoduje nejen jejich interakce se stacionární fází, ale také složení mobilní fáze. Díky možnosti vybrat si pro stanovovaný vzorek vhodnou mobilní fázi, existuje pro separaci v kapalinové chromatografii větší pravděpodobnost dosáhnout ideálních podmínek než například v chromatografii plynové [40]. Separační účinnost je také závislá na velikosti částic stacionární fáze a na dostatečně rychlém průtoku mobilní fáze, kterou zajišťuje čerpadlo pod vysokým tlakem [41].

V klasické kapalinové chromatografii byla jako kolona používána skleněná trubice umístěná ve svislé poloze a naplněná zrnitým sorbentem s velkými částicemi. Na horní vrstvu sorbentu byl dávkován vzorek a následovně kapalná mobilní fáze. Mobilní fáze postupovala kolonou působením gravitační síly, a tak docházelo k separaci. Toto kolonové provedení ale nemělo potřebnou účinnost. Stalo se však základem vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), která na rozdíl od klasické kapalinové chromatografie pro účinnou separaci používá dostatečně malá zrníčka sorbentu a působení vysokého tlaku. K separaci jsou využitelné všechny možné mechanismy – adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, molekulově síťový efekt, iontová výměna či specifické interakce v afinitní chromatografii [40].

3.2.1 Technologický pokrok v kapalinové chromatografii

Zkratka HPLC původně označovala technologii *High Pressure Liquid Chromatography*. Důraz byl kladen na skutečnost, že pro potřebný průtok mobilní fáze skrze kolonu je třeba vysoký tlak. Na začátku vývoje HPLC technologie byla tlaková kapacita pouze 3,5 MPa. Důsledkem rychlého technologického rozmachu byl roku 1970 sestrojen přístroj, který byl schopen vyvinout tlak okolo 40 MPa. To pro výrobu stacionárních fází umožnilo použití menších částic ($< 10 \mu\text{m}$), které dříve nemohly být využívány kvůli zvýšenému zpětnému tlaku. Zároveň k přístroji přibýly lepší dávkovače, detektory i kolony. Zkratka HPLC zůstala stejná, ale název byl změněn na *High Performance Liquid Chromatography* [42].

K dalšímu pokroku přístrojového vybavení a technologie kolon v oblasti kapalinové chromatografie došlo v roce 2004. Nové kolony obsahují částice o velikosti $< 2 \mu\text{m}$. Přístroj umožňuje vyvinout tlak okolo 100 MPa. Tato technologie dostala název *ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC)* [42].

3.2.2 Technika UHPLC

Jelikož bylo dokázáno, že zmenšování částic stacionární fáze vede ke zlepšení separační účinnosti, zvýšení citlivosti a zkrácení retenčních časů, vývoj nových kolon byl soustředěn tímto směrem. Změna velikosti částic byla následující: roku 1980 ($5 \mu\text{m}$), 1990 ($3 - 3,5 \mu\text{m}$), 1996 (neporézní silikagelové částice o velikosti $1,5 \mu\text{m}$), 2004 (porézní silikagelové částice o velikosti $1,5 - 2 \mu\text{m}$). Nicméně nevýhodou takto malých částic je nežádoucí zvýšení zpětného tlaku ($> 40 \text{MPa}$), který je neslučitelný s běžným přístrojovým vybavením HPLC technologie. Proto bylo třeba vyvinout nový systém, který bude tento fakt tolerovat. Problém rostoucího zpětného tlaku lze také redukovat zvýšením teploty, čímž je docíleno snížení viskozity eluentů (a tedy snížení tlaku), nebo použitím speciálních stacionárních fází tvořených neporézními částicemi [43].

Další rozdíl mezi HPLC a UHPLC metodou je ve velikosti průměru kolon. Zatímco u HPLC je průměr kolon relativně široký (což způsobuje menší koncentrovanost analytu, větší možnost pohybu molekul v koloně, široké píky a nižší citlivost), UHPLC kolony jsou tenčí a na chromatogramu se projeví užšími a vyššími píky o větší senzitivitě. Metoda UHPLC má také oproti HPLC nižší spotřebu eluentů (díky kratší době analýzy) [44].

Obecně tedy platí, že UHPLC systémy musí vydržet vysoký zpětný tlak, měly by být přizpůsobeny provozu v rychlém a ultra rychlém režimu se sníženým průměrem kolon (2,1 mm). Snižují spotřebu rozpouštědel a využívají pouze malé objemy analyzovaných látek. UHPLC technologie dále vyžaduje robustní čerpací a vstřikovací moduly, rychlé vstřikovací cykly, malé zpoždění gradientového objemu, rychlou detekční konstantu, vysokou frekvenci sběru dat, vhodné kolony a stacionární fáze. Jednotlivé UHPLC systémy se v závislosti na výrobci liší ve výši maximálního zpětného tlaku, rychlosti průtoku, objemem nástřiku, mrtvým objemem, teplotním rozmezím a dalšími parametry. Přehled aktuálně dostupných UHPLC přístrojů uvádí tabulka 4 [43 - 46].

Název přístroje	Uvedení na trh	Výrobce	Maximální zpětný tlak [MPa]	Průtok [ml/min]	Teplota [°C]	Objem nástřiku [μl]
Acquity UPLC	2004	Waters	100	až 2	až 90	0,1 - 50
Acella High Speed	2006	Thermo Electron	100	až 2	až 100	1 - 1000
X-treme LC	2006	Jasco	100	až 10	až 65	0,1 - 100
LChrom Ultra	2007	Hitachi	60	až 5	až 85	0,1 - 50
RSLC UltiMate 3000	2008	Dionex	80	až 5	až 110	0,01 - 500
Platin Blue	2008	Knauer	100	až 2	až 140	1 - 500
Flexar	2009	Perkin Elmer	100	-	až 90	minimálně 1
Infinity	2009	Agilent	120	až 5	až 100	0,1 - 100
Acquity UPLC H-Class	2010	Waters	104	až 2	až 90	< 400
Nexera	2010	Shimadzu	130	až 3	až 150	0,1 - 100

Tabulka 4: Přehled aktuálně dostupných UHPLC přístrojů [46]

Bylo potvrzeno, že použití vysokého tlaku a stacionárních fází s malými částicemi je jedním z nejlepších řešení, jak urychlit analýzu při zachování její účinnosti a rozlišení. Účinností chromatografické separace (vyjádřené jako výškový ekvivalent teoretického patra H) se podrobněji zabývá van Deemterova teorie, která popisuje děje přispívající k rozmývání zón separovaných látek [44].

Výškový ekvivalent teoretického patra lze vypočítat podle vzorce:

$$H = A + B/u + C \times u$$

A = vířivá difúze analytu v mobilní fázi při průchodu náplní kolony

B = podélná difúze analytu v mobilní fázi

C = odpor proti převodu hmoty mezi mobilní a stacionární fází

u = lineární průtoková rychlost [44].

(A) *Vířivá difúze*

Vířivá difúze je závislá na různorodosti stacionární fáze. Mobilní fáze v širších kanálcích proudí jinou rychlostí, než v kanálcích užších. Je ovlivňována velikostí a tvarem částic, strukturou pórů, kvalitou kolony (materiál, drsnost, průměr) a rychlostí průtoku mobilní fáze. Se zmenšujícím se průměrem částic jsou eluovány užší píky, díky kterým vzrůstá účinnost analytické kolony [44].

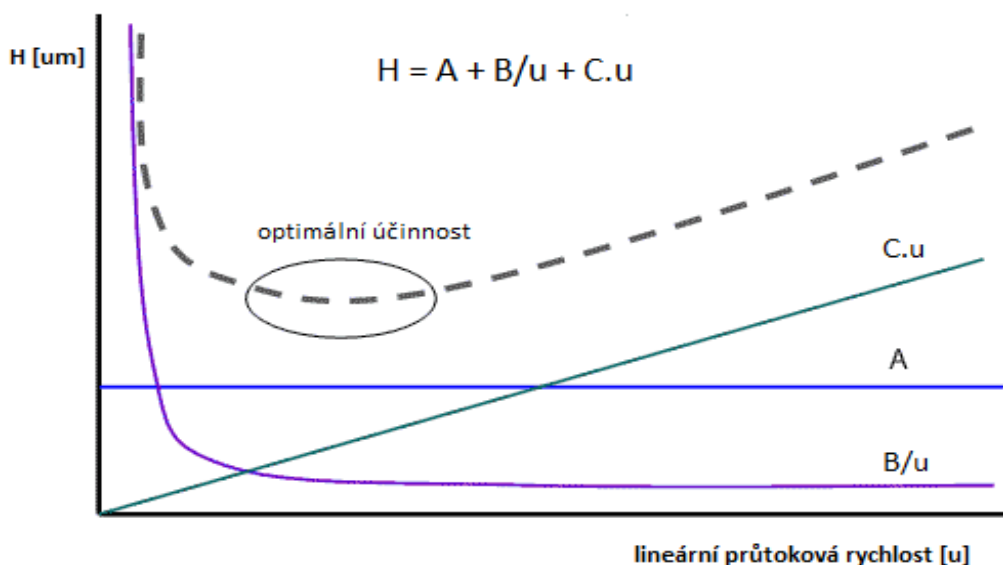
(B) *Podélná difúze*

Molekuly analytu se v mobilní fázi šíří podélně, nezávisle na směru proudění. Některé molekuly se kolonou pohybují rychleji, jiné pomaleji než ostatní, což při pomalém průtoku způsobí rozmývání zón. Při vyšší průtokové rychlosti molekuly analytu projdou kolonou v kratším čase, což způsobuje vyšší koncentrovanost zóny analytu. Píky proto budou užší, a tak je docíleno zvýšení účinnosti a zkrácení doby analýzy. Podélná difúze je ovlivňována lineární rychlostí mobilní fáze, teplotou, typem analytu či difúzním koeficientem. Není přímo závislá na velikosti částic [44].

(C) *Odpor proti převodu hmoty mezi mobilní fází a stacionární fází*

Vztahuje se k přenosu molekul analytu mezi stacionární a mobilní fází. Je závislý na rychlosti průtoku, kterým se docílí rovnovážného rozdělení analytu mezi fázemi. Dále je ovlivňována velikostí částic, retenčním faktorem, viskozitou mobilní fáze, složením stacionární fáze či teplotou [44].

Van Deemterova křivka vzniká sloučením křivek A, B, C (obrázek 5).



Obrázek 5: Van Deemterova křivka [47]

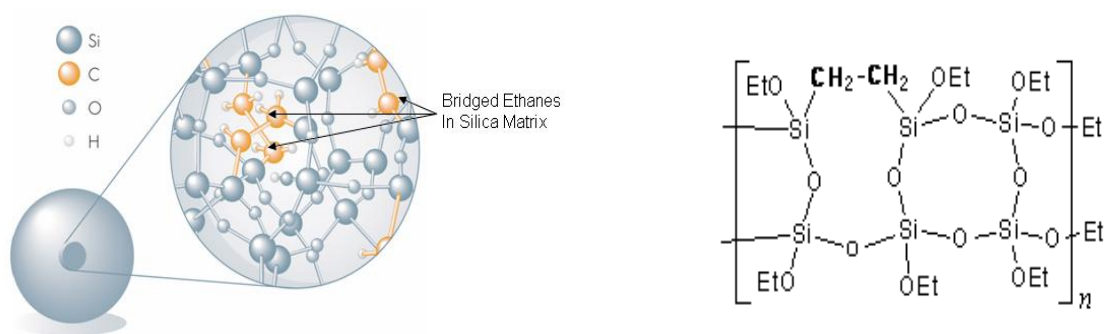
Mobilní fáze pro UHPLC

Při přípravě mobilních fází je důležité dbát na absenci nerozpustných částic v rozpouštědlech, protože velikost frit a částic obsažených v kolonách je mnohem menší než u HPLC. Měly by být používány pouze vysoce kvalitní organická rozpouštědla (filtrovaná přes 0,22 µm membránu) a velmi čistá filtrovaná voda [45].

Stacionární fáze pro UHPLC

V průběhu posledních pěti let bylo vyrobeno velké množství nových stacionárních fází s částicemi menšími než 2 µm. Sorbenty jsou většinou založeny na silikagelovém nebo hybridním podkladě. Tyto nosiče mohou být dále modifikovány různými funkčními skupinami (tabulka 5). Jednou z výhod hybridních fází je vysoká chemická stabilita, která umožňuje pracovat v široké oblasti pH (1 – 12). Silikagelové sorbenty využívají rozmezí pH 2 – 8 [46]. Kolony od jednotlivých výrobců se svými vlastnostmi liší. Například firma Waters vyrábí kolony založené na technologii „bridged hybrid particle“ (hybridní stacionární fázi), která vyniká svou mechanickou pevností a separační účinností (obrázek 6) [44][46].

UHPLC kolony mají řadu výhod: částice o velikosti < 2 µm umožňují dobré rozlišení, kratší dobu analýzy, možnost použití vysokého pH i teplot a UV, MS či amperometrickou detekci [42].



Obrázek 6: Znázornění ethylenového můstku v matici silikagelového nosiče [48]

Název kolony	Nosič	Velikost částic[μm]	pH	Funkční skupina	Teplota [°C]	Výrobce
Acquity BEH	Hybridní	1,7	1 - 12 2 - 11 1 - 8 2 - 11	(C8, C18, Fenyl) (Shield) (HILIC) (Amid,Glykan – HILIC)	20 – 90	Waters
Acquity HSS	Silikagel	1,8	2 - 8 1 - 8	(T3, C18 SB) (C18)	20 – 45	Waters
Alltima HP	Hybridní	1,5	1 - 10	(HILIC)	20 – 60	Alltech
Platinum	Silikagel	1,5	2 - 8	(C8, C18)	20 – 60	Alltech
GP Series	Silikagel	1,8	2 - 8,5	(C8, C18, C4)	20 – 60	Sepax
HP Series	Silikagel	1,8	2 - 8,5	(PHE, CN, NH ₂ SCX, SAX, silikagel, HILIC)	20 – 60	Sepax
Hypersil Gold	Silikagel	1,9	1 - 11 2 - 9	(C18) (C8, Q)	25 – 60	Thermo Electron
Nucleodur	Silikagel	1,8	1 - 11 1 - 10	(C8, C18) (C18 isis, Sphinx RP)	až 85	Machery Nagel
Pathfinder	Hybridní	1,5	1 - 12	(AS, AP, PS, MR)	až 250	Shimadzu
Pinnacle DB	Silikagel	1,9	2,5- 7,5	(C18, CN, PFP-propyl, silikagel, C8)	až 80	Restek
TSKgel Super ODS	Silikagel	2,0	2,5- 7,5	(C18, C8, PHE)	20 - 60	Tosoh
YMC ultr.fast	Silikagel	2,0	2 – 8	(C18, Hydro C18)	20 – 60	YMC
Zorbax	Silikagel	1,8	2 – 9	(Eclipse plus C8, C18)	až 60	Agilent

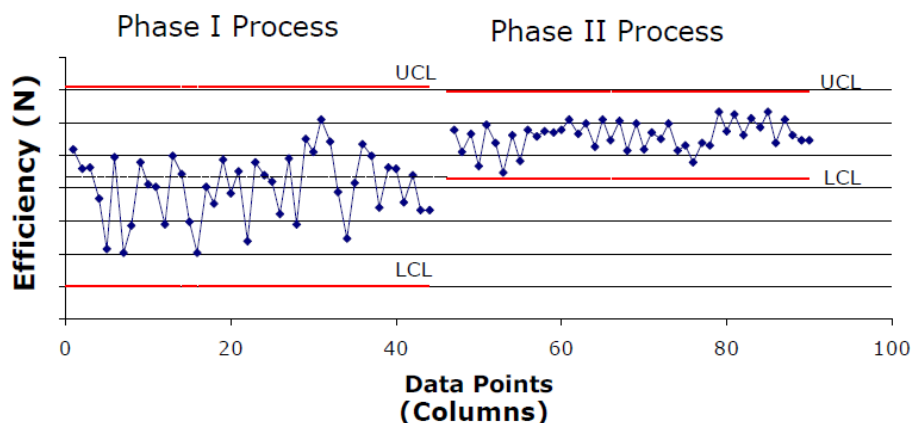
Tabulka 5: Příklady aktuálně dostupných analytických kolon s velikostí částic < 2 μm [46]

Pro měření této diplomové práce byly použity následující kolony:

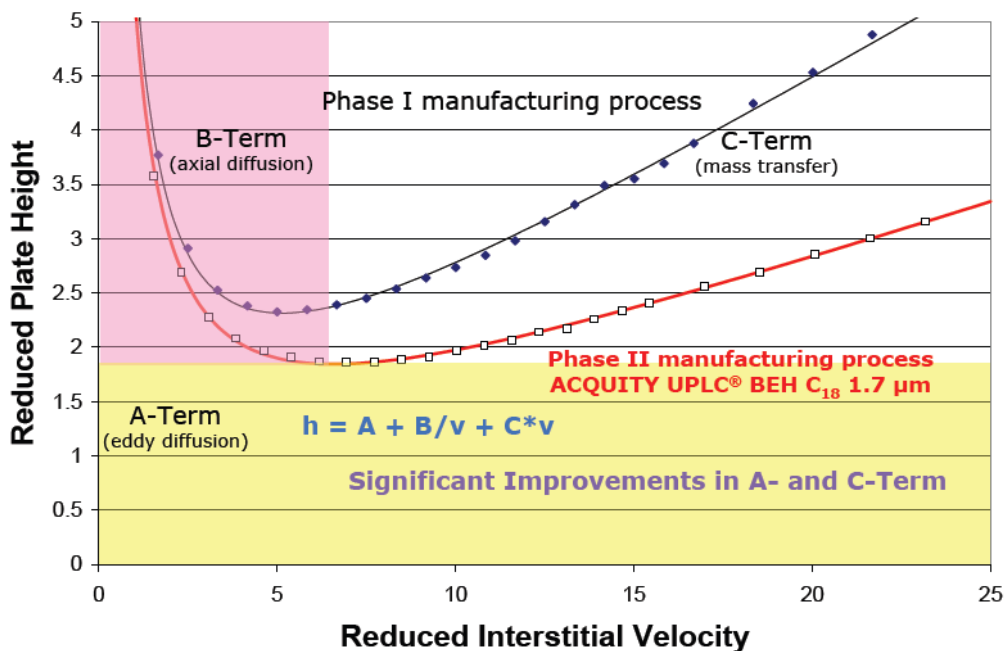
Kolona	BEH HILIC	BEH GLYKAN	BEH AMIDE
pH rozmezí	1 - 8	2 – 11	2 - 11
Teplotní limit [°C]	Nízké pH = 45°C Vysoké pH = 45°C	Nízké pH = 90°C Vysoké pH = 90°C	Nízké pH = 90°C Vysoké pH = 90°C
Velikost částic [μm]	1,7	1,7	1,7
Velikost pórů	130 Å	130 Å	130 Å
Plocha povrchu [m^2/g]	185	185	185
Pokrytí uhlíkem [%]	-	12%	12%
Typ sorbentu	BEH	BEH	BEH
Aplikace	Velmi polární, bazické a ve vodě rozpustné lát.	Analýza fluorescenčně označených glykanů	Velmi polární látky, zejména sacharidy
Možnost spojení s:	MS, UV, Fluorescence	MS, UV, Fluorescence	MS, UV, Fluorescence
Generace BEH sorbentu:	-	I	II

Tabulka 6: Porovnání vlastností kolon BEH HILIC, BEH GLYKAN a BEH AMIDE [42]

Kolony BEH AMIDE a BEH GLYKAN jsou chemicky shodné (tabulka 5), přesto se ale liší. Kolona BEH GLYKAN je amidová stacionární fáze první generace, na rozdíl od kolony BEH AMIDE, která patří do generace druhé. Viditelný pokrok ve vývoji technologie kolon je znázorněn na obrázcích 7 a 8, ze kterých je patrné, že amidová fáze druhé generace více maximalizuje účinnost a minimalizuje variabilitu vyráběných kolon [49].



Obrázek 7: Porovnání účinnosti amidové stacionární fáze první a druhé generace [49]

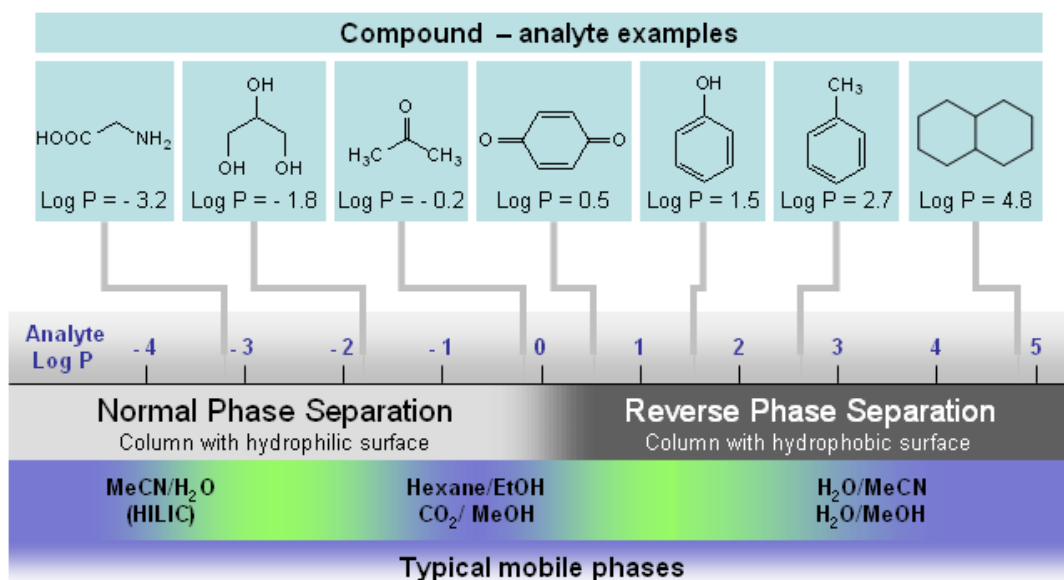


Obrázek 8: Porovnání optimální účinnosti amidové stacionární fáze první a druhé generace pomocí van Deemterových křivek [49]

3.2.3 NP-HPLC, RP-HPLC

Kapalinová chromatografie byla objevena pozorováním separace barevných směsí na polárních sorbentech (např. celulózová vlákna, anorganické oxidy), kde byly jednotlivé látky vymývány pomocí nepolárních organických rozpouštědel. Tento způsob uspořádání byl nazván chromatografie na normálních fázích (NP-HPLC). Měl však několik nedostatků, mezi které patřila např. pomalá ekvilibrace, špatná rozpustnost polárních analytů v mobilní fázi, chvostující píky či toxické a prostředí znečišťující mobilní fáze (např. heptan, hexan, cyklohexan, pentan) [50][51].

Roku 1970 se začaly objevovat první kolony s chemicky modifikovanými stacionárními fázemi, které byly charakteristické opačnou polaritou, a to s nepolární stacionární fází a polární mobilní fází (např. vodný roztok organického rozpouštědla mísitelného s vodou). Tato metoda byla nazvána chromatografie na obrácených (reverzních) fázích (RP-HPLC). Ukázkou možnosti retence některých analytů na NP-HPLC či RP-HPLC naznačuje obrázek 9 [50][51].



Obrázek 9: Ukázkou možnosti retence některých analytů na NP-HPLC a RP-HPLC v závislosti na rozdělovacím koeficientu oktanol – voda (log P) [52]

V chromatografii mezi nejproblematičtější analyty patří sloučeniny vysoce hydrofilní a nenabitě. Postrádají totiž interakce na základě Coulombových sil a polární skupiny obvykle způsobí nízkou těkavost. Jedním ze způsobů, jak zvýšit retenci takových látek, je pomocí chemických reakcí přeměnit jednu nebo více polárních funkčních skupin na hydrofobní. Tato technika je nazývána derivatizace. Derivatizace

může zlepšit detekovatelnost, ale na druhou stranu je časově náročná a do kvantitativní analýzy vnáší nepřesnost. Dalším způsobem, jak řešit analýzu nenabitých a vysoce hydrofilních sloučenin, je pomocí metody zvané *Chromatografie hydrofilních interakcí* [50 - 57].

3.2.4 Chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC)

Ačkoli zkratku HILIC navrhl Alpert již roku 1990 [58], podstatný nárůst popularity této separační metody byl zaznamenán až od roku 2003 [59].

HILIC je chromatografickou technikou, kterou lze použít ke zlepšení retence velmi polárních sloučenin, které jsou na RP-HPLC zadržovány jen slabě [53]. Stejně jako NP-HPLC používá HILIC polární stacionární fáze. Mobilní fáze je podobná RP-HPLC. Obsahuje určité množství vody a polární rozpouštědlo (ACN, aceton, metanol) [60][61]. Oproti konvenčním normálním či reverzním metodám má HILIC metoda mnoho specifických výhod, které jsou uvedeny na konci kapitoly.

Mechanismus HILIC

Princip metody HILIC je poněkud diskutabilní. Zatímco retence u konvenční NP-HPLC je založena převážně na povrchově adsorpčním jevu, v HILIC je retenční mechanismus rozdělovací, kdy rozpouštědlem o vysoké eluční síle je voda. Alpert podporoval myšlenku, že retenční mechanismus je založen na rozdělení analyzované látky mezi objem hydrofilní mobilní fáze a vodou obohacenou vrstvou, která je částečně navázaná na polární stacionární fázi. Existují dva faktory, kterými se retence řídí. Prvním faktorem je vodíková vazba, jejíž rozsah závisí na kyselosti nebo zásaditosti rozpuštěných látek. Druhým faktorem je interakce dipól - dipól, která je závislá na dipólových momentech a polaritě mobilní fáze. Primární funkcí HILIC stacionární fáze je tedy vázat vodu. Nicméně retence bývá ovlivňována také elektrostatickými (iontovými) interakcemi, a to v případě nabitých HILIC stacionárních fází [50][62 - 64].

Mobilní fáze pro HILIC

Mobilní fáze se v HILIC skládá z vysokého procenta organického rozpouštědla mísitelného s vodou (nejčastěji 40 – 97% acetonitrilu) a malého procenta vody nebo těkavého pufru (minimálně 2,5 % v/v). Na rozdíl od většiny ostatních chromatografických technik je část mobilní fáze nedílnou součástí stacionární fáze,

a proto je velmi důležité udržovat koncentraci vody v eluentu v určitých mezích, aby byla dosažena dostatečná hydratace částic stacionární fáze [64].

Pufry vhodné pro HILIC zahrnují amonné soli octanu či mravenčanu. Dále je také doporučována kyselina octová či mravenčí, díky vynikající rozpustnosti i ve velmi vysokých koncentracích organických rozpouštědel. Fosfáty a jiné málo rozpustné pufry jsou sice spojeny s vyšší citlivostí při UV detekci, ale měly by být používány s opatrností, aby se zabránilo nežádoucímu srážení. Je-li pro analýzu požadováno vyšší pH, používá se hydroxid nebo uhličitan amonný [64].

Vymývání polárních analytů je umožněno zvýšením polaritý mobilní fáze, tedy zvýšením obsahu vody v mobilní fázi. Naproti tomu je-li třeba dosáhnout většího zadržení polárního analytu v chromatografickém systému, zvýší se koncentrace organického rozpouštědla v mobilní fázi. V HILIC bude retenční pořadí opačné ve srovnání s pořadím analytů vymývaných při RP-HPLC. Analyty budou vymývány v pořadí rostoucí hydrofility [64 - 66].

Stacionární fáze pro HILIC

Stacionární fáze pro HILIC jsou hydrofilního charakteru a v určitém rozmezí pH bývají také poměrně často nabitě. Sloučeniny oddělující se na koloně interagují se stacionární fází. Obecně lze stacionární fáze pro HILIC separaci rozdělit na fáze na silikagelovém a na polymerním podkladě. Častěji jsou používány kolony na bázi silikagelu, které netolerují mobilní fáze o vysokém pH. Rozsah pH vhodný pro silikagelové HILIC kolony se pohybuje mezi 3 – 8. Kolony na polymerním podkladě mají pH 2 – 10, přesto se využívají mnohem méně [64].

Pro HILIC separace lze použít například tyto stacionární fáze: silikagel modifikovaný aminopropylovými skupinami, polysukcimidem a jeho deriváty, amidoskupinami, diolovou skupinou, kyanopropylovými skupinami či sulfoalkylbetainem, nemodifikovaný silikagel, nesilikagelové stacionární fáze modifikované aminoskupinami či kolony s cyklodextrinem [51] [64].

Příklady látek separovaných v HILIC

Metoda HILIC nabývá v oblasti výzkumu stále většího významu. Dnes je využívána zejména k detekci sacharidů [67 - 68], oligosacharidů [69 - 70], saponinů [71 - 72], glykanů [73], glykopeptidů [74 - 75], peptidů [76 - 77], aminokyselin [78 - 80], histonů [81], bílkovin [82 - 83], ale také antibiotik a cytostatik [84 - 85],

kokainu [86], toxinů [87 - 89], syntetických polymerů [90], přírodních extraktů [91 - 92] či metabolitů [93 - 94].

Výhody HILIC separace

Mezi hlavní výhody použití této metody patří:

- dobrá retence polárních sloučenin
- snížení zpětného tlaku, což umožňuje použití vyšší průtokové rychlosti, delších kolon a menších velikostí částic stacionární fáze
- symetrické tvary píků
- přímé dávkování extraktů z RP-SPE (kompatibilita rozpouštědel s mobilní fází)
- použití mobilních fází šetrnějších k životnímu prostředí (nepoužívá toxická organická rozpouštědla)
- snadnější příprava mobilní fáze (v NP-HPLC nesměla obsahovat vodu, nepotřebuje drahá činidla iontových párů, atd.)
- zvýšení citlivosti hmotnostní spektrometrie díky přítomnosti vysokého procenta organického rozpouštědla v mobilní fází
- metoda je oproti NP-HPLC reprodukovatelnější [51][60].

Nevýhody HILIC separace:

- vysoká spotřeba acetonitrilu (nákladné)
- nedostatečná rozpustnost některých sloučenin v organickém rozpouštědle [60].

3.3 VALIDACE ANALYTICKÉ METODY

Pomocí validace byly zjišťovány nejdůležitější charakteristiky analytické metody. Jejím smyslem bylo ověřit, zda je vypracovaná metoda pro dané použití vhodná. Cílem validace bylo určit podmínky, za kterých by byl zkušební postup použitelný, a zároveň stejně spolehlivý i při opakovaném použití v jiných laboratořích [38].

3.3.1 Test způsobilosti systému

Test způsobilosti systému představuje nedílnou součást validace analytické metody a slouží k zajištění přiměřené účinnosti chromatografického systému. Při každém novém použití metody není třeba opakovat celou validaci, ale jsou definována pouze určitá kritéria, která musí být splněna. V případě splnění těchto požadavků testu způsobilosti se předpokládá, že dříve provedená validace platí [38].

Účinnost chromatografické kolony a zdánlivý počet teoretických pater

Účinnost kolony charakterizuje její schopnost separovat složky směsi. Čím je kolona účinnější, tím lépe od sebe dokáže oddělit jednotlivé látky. Účinnost kolony roste s počtem teoretických pater kolony N . Teoretické patro je pomyslná část kolony, ve které dochází k ustavení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází.

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

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

t_R = retenční čas (nebo objem) nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce
 w_h = šířka píku v polovině jeho výšky

Z počtu teoretických pater (N) lze pro kolonu o délce L vypočítat výškový ekvivalent teoretického patra H :

$$H = L/N$$

Na základě tohoto parametru je možné porovnávat účinnost chromatografických kolon o různých délkách [40] [95].

Faktor symetrie chromatografických píků

Faktor symetrie píků (A_S) vyjadřuje symetrii chromatografického píku a dá se vypočítat podle vzorce:

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

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

d = vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky

Hodnota faktoru symetrie 1,0 značí úplnou (ideální) symetrii píku [95].

Rozlišení chromatografických píků

Rozlišení (R_S) mezi píky dvou složek se může vypočítat podle vzorce:

$$R_S = 1,18 \times (t_{R2} - t_{R1}) / (w_{h1} + w_{h2}), \text{ kde } t_{R2} > t_{R1}$$

t_{R1} a t_{R2} = retenční časy látek

w_{h1} a w_{h2} = šířky píků v poloviční výšce

Rozlišení větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii. Nejsou-li píky rozděleny na základní linii, vzorec nemusí být použitelný [95].

Opakovatelnost

Opakovatelnost je ověření spolehlivosti metody prováděné během krátkého časového intervalu za stejných podmínek (ve stejné laboratoři, stejným pracovníkem).

Je vyjádřena jako odhad relativní směrodatné odchylky ($RSD\%$) v procentech pro řadu následných měření porovnávacího roztoku. Vypočítá se podle vzorce:

$$RSD\% = (100/y) \times \sqrt{[\Sigma(y_i - y)^2 / (n - 1)]}$$

y_i = jednotlivé hodnoty vyjádřené jako plocha píku, výška píku nebo poměr

plach u metody vnitřního standardu

y = průměr jednotlivých hodnot

n = počet jednotlivých hodnot [95].

Kapacitní faktor

Kapacitní faktor určuje schopnost látek dělit se mezi stacionární a mobilní fázi. Je to bezrozměrné číslo. Čím vyšší je jeho hodnota, tím více bude látka v koloně zadržována. Vypočítá se podle vzorce:

$$k = (t_R - t_M) / t_M$$

k = kapacitní faktor

t_R = retenční čas (nebo objem)

t_M = mrtvý čas (nebo objem) nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího nezadržované složce [95].

3.3.2 Validace metody

Správnost

Správnost vyjadřuje shodu mezi správnou hodnotou a získaným výsledkem. Analýza je prováděna obvykle nejméně se šesti vzorky. Správnost může být vyjádřena jako rozdíl správné a získané hodnoty, nebo jako výtěžnost R, která se vypočítá podle vzorce:

$$R (\%) = 100 \times c_i / c_o$$

c_i = koncentrace stanovená u testovaného vzorku

c_o = správná známá koncentrace [38]

Přesnost

Přesnost je míra shody jednotlivých výsledků metody opakovaně získaných s jedním homogenním vzorkem. Podle podmínek opakování se rozlišují tři úrovně přesnosti – opakovatelnost, mezilehlá přesnost a reprodukovatelnost. Přesnost se vyjadřuje pomocí relativní směrodatné odchylky [38].

Selektivita

Selektivita je schopnost metody změřit správně a specificky danou látku v přítomnosti jiných látek, které se mohou ve vzorku vyskytovat. Je určována porovnáváním výsledků vzorků standardů s výsledky testovaných vzorků [38].

Detekční limit

Detekční limit (LOD) určuje nejnižší detekovatelnou koncentraci látky, která se nestanovuje kvantitativně. Charakterizuje citlivost metody. U instrumentálních metod se může určit jako koncentrace analyzované látky s poměrem signálu k šumu s hodnotou 3. Analýzou příslušné koncentrace vzorku se ověří nalezený detekční limit [38].

Kvantitativní limit

Kvantitativní limit (LOQ) je také parametrem citlivosti metody. Určuje nejnižší koncentraci látky, která je ještě stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Za limitující relativní směrodatnou odchylku se považuje 10 %. Kvantitativní limit se často vyjadřuje jako koncentrace s poměrem signálu k šumu s hodnotou 10 [38].

Linearita

Linearita je schopnost metody dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky. Stanovuje se obvykle minimálně pět různých koncentrací v rozmezí 50 - 150 % deklarovaného obsahu. Při této metodě se pracuje s roztoky standardů, protože rušivé vlivy reálných vzorků jsou hodnoceny jinými parametry validace [25].

Rozsah

Rozsah se obvykle odvozuje z linearitě metody. Představuje koncentrační rozmezí, ve kterém může být metoda používána. Za dolní limit může být považován detekční limit a za horní limit maximální odezva, při jejímž překročení už přístroj nepracuje přesně [38].

Robustnost

Robustnost vyjadřuje míru proměnných podmínek na výsledky analýzy. Během analýzy jsou sbírány poznatky z vývoje metody s cílem upozornit na podmínky, které by mohly ovlivňovat výsledky. Například u HPLC se sledují tyto podmínky: složení mobilní fáze, pH vodné složky mobilní fáze, teplota na koloně, rychlost průtoku, stabilita analyzovaných vzorků či rozdíl mezi kolonami [38].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 MATERIÁLY A POMŮCKY

4.1.1 Přístrojové vybavení

- **UHPLC:** ACQUITY UHPLC SYSTEM, Waters, ČR
Pumpa: ACQ-binary solvent manager, Waters, ČR
Dávkovací jednotka: ACQ sample manager, Waters, ČR
Termostat: ACQ column manager, Waters, ČR
Detektory: ACQ FLR detektor, Waters, ČR
Program: Empower 2
- **Chromatografické kolony:**
ACQUITY UPLC BEH AMIDE 1,7 μm , 2,1 \times 100 mm, Waters, ČR
ACQUITY UPLC BEH HILIC 1,7 μm , 2,1 \times 100 mm, Waters, ČR
ACQUITY UPLC BEH GLYCAN 1,7 μm , 2,1 \times 100 mm, Waters, ČR
- **Laboratorní pH metr:** Hanna, FISCHER SCIENTIFIC, ČR
- **Analytické váhy:** Sartotius 2004 MP, SARTORIUS, Německo
- **Automatické pipety se špičkami:** Biohit, FISCHER SCIENTIFIC, ČR
- **Minitřepačka:** Ika Works, USA
- **Ultrazvuková vodní lázeň:** Sonorex Digitec, BANDELIN ELECTRONIC, Berlín
- **Vakuová pumpa a filtrační zařízení:** MEDIST s.r.o., Slovensko

4.1.2 Chemikálie

- **Biopterin**, $\geq 98\%$, SIGMA – ALDRICH, ČR
- **Neopterin**, $\geq 97,5\%$, SIGMA – ALDRICH, ČR
- **7,8 – dihydroneopterin**, $\geq 97,0\%$, SIGMA – ALDRICH, ČR
- **7,8 – dihydrobiopterin**, $\geq 94,0\%$, SIGMA – ALDRICH, ČR
- **Acetonitril R**, CHROMASOLV for HPLC, SIGMA – ALDRICH, ČR
- **Kyselina octová koncentrovaná**, 99%, FLUKA, SIGMA – ALDRICH, ČR
- **Octan amonný**, 99%, FLUKA, SIGMA – ALDRICH, ČR
- **Hydroxid amonný**, 25%, FLUKA, SIGMA – ALDRICH, ČR
- **Ultračistá voda pro HPLC**

4.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

4.2.1 Příprava zásobních roztoků

Pteridiny jsou látky poměrně polární, a proto byla pro jejich rozpuštění nejdříve použita ultračistá voda. Deriváty biopterinu a neopterinu (BH₂, NH₂) byly ve vodě snadno a rychle rozpustné. Určité problémy byly u biopterinu a neopterinu, které ve vodě nebyly zcela rozpustné, a proto byla použita směs acetonitrilu s vodou v poměru 50:50. S použitím třepačky byly v této směsi dané vzorky rozpuštěny. Koncentrace pteridinů v zásobních roztocích byla u všech zkoumaných látek 10⁻⁴ mol/l.

Zásobní roztoky biopterinu a neopterinu byly při správném skladování stabilní. Byly uchovávány v mrazáku a každé ráno byly rozmrazovány. Naproti tomu roztoky dihydroneopterinu a dihydrobiopterinu byly velice nestabilní a postupem času podléhaly oxidaci. Rychlé uložení vzorků do mrazáku nepomohlo. Proto byly každý den připravovány vzorky čerstvé. Uchovávány byly ve tmavých vialkách bez přístupu kyslíku. Mezi jednotlivými analýzami byly ukládány do lednice o teplotě 4 °C nebo do mrazáku.

Kvůli vysoké nestabilitě dihydrobiopterinu a dihydroneopterinu byla hledána alternativa, jak tento problém vyřešit. V mnoha publikacích bylo uvedeno, že pro zvýšení stability byl použit roztok dithiothreitolu (DTT) nebo kyseliny askorbové. Následně bylo zkoušeno několik koncentrací DTT (0,1%, 0,5% a 1,0%) a několik koncentrací kyseliny askorbové (0,1%, 0,5% a 1,0%). Nejlepší vliv na plochy píků měla 0,5% koncentrace DTT. Proto byla směs acetonitrilu s vodou (50:50) později změněna na směs acetonitrilu s 0,5% roztokem DTT v poměru 50:50.

4.2.2 Příprava pracovních roztoků

Pracovní roztoky pteridinů používaných v průběhu analýzy byly u BIO a NEO připravovány smísením 10 µl zásobního roztoku a 990 µl rozpouštědla tvořeného směsí acetonitrilu a vody (50:50) a u BH₂ a NH₂ smísením 100 µl zásobního roztoku a 900 µl rozpouštědla. Později byla tato směs nahrazena směsí acetonitrilu s 0,5% DTT (50:50).

Koncentrace pteridinů v pracovních roztocích byla 10⁻⁵ mol/l u BH₂ a NH₂ a 10⁻⁶ mol/l u BIO a NEO. Pracovní roztoky byly každé ráno před prvním měřením připravovány vždy nové. Ředěny byly do tmavých vialek, které sloužily jako ochrana před světlem a po odpipetování potřebného množství byly ukládány zpět do lednice či mrazáku. Vzorky připravené pro separaci byly ukládány do autosampleru, který byl

chlazen na 4 °C. V pozdních odpoledních hodinách již bylo nutné pro NH₂ a BH₂ připravit vzorky nové, neboť u nich docházelo k oxidaci a zkreslování výsledků.

4.2.3 Příprava vodných složek mobilní fáze

- 0,1% roztok kyseliny octové byl připraven přidáním 100 µl kyseliny octové do vody a doplněním v odměrné baňce do 100 ml.
- 0,5% roztok kyseliny octové byl připraven přidáním 1 ml koncentrované kyseliny octové do vody a doplněním v odměrné baňce do 200 ml. Kyselina octová byla vždy vstříkována pod hladinu vody.
- Roztoky octanu amonného o koncentraci 50 mmol/l a pH 3,8, 4,8 a 5,8 byly připraveny přidáním 570 µl koncentrované kyseliny octové do kádinky se 150 ml vody. Směsi byly dále titrovány zředěným roztokem hydroxidu amonného až do dosažení požadované hodnoty pH. Poté byly převedeny do 200 ml odměrné baňky a doplněny po rysku vodou.
- Roztoky octanu amonného o koncentraci 50 mmol/l a pH 6,8, 7,8, 8,8 a 9,8 byly připraveny navážením 0,3854 g octanu amonného a jeho rozpuštěním v 75 ml vody. Směsi byly dále titrovány zředěným roztokem hydroxidu amonného až do dosažení požadované hodnoty pH. Poté byly převedeny do odměrné baňky, doplněny vodou do 100 ml a zfiltrovány.
- Roztok octanu amonného o koncentraci 100 mmol/l a pH 9,8 byl připraven navážením 0,7708 g octanu amonného a jeho rozpuštěním v 75 ml vody. Směs byla dále titrována zředěným roztokem hydroxidu amonného až do dosažení hodnoty pH 9,8. Poté byla převedena do odměrné baňky, doplněna vodou do 100 ml a zfiltrována.
- Roztok octanu amonného o koncentraci 10 mmol/l a pH 9,8 byl připraven zředěním 10 ml roztoku octanu amonného o koncentraci 100 mmol/l a pH 9,8 vodou, která byla doplněna v odměrné baňce do 100 ml.

Všechny roztoky byly po přípravě dány na 10 minut do ultrazvukové lázně, aby došlo k dokonalejšímu odplynění, které bylo nutné z důvodu fluorescenční detekce. Pro správnost metody bylo důležité vždy při výměně mobilní fáze, změně poměru koncentrací stávající fáze či výměně kolony nechat přístroj po určitou dobu (15 až 20 minut) ustálit. To není pro UHPLC techniku obvyklé, avšak kvůli ustálení rovnováhy v systému HILIC to bylo nutné.

Mobilní fáze byly v den měření každé ráno připravovány čerstvé. Voda používaná pro přípravu mobilní fáze byla vždy přefiltrovaná. Do separační kolony byla mobilní fáze vháněna pomocí binárního čerpadla, které zároveň mísilo organickou a vodnou složku. Složení mobilní fáze se většinou pohybovalo v těchto poměrech (ACN : vodná složka): 50:50, 60:40, 70:30, 75:25, 80:20, 85:15, 90:10 a 95:5. V případě potřeby detailnějšího oddělení jednotlivých píků, byly zkoušeny i jiné poměry. Souhrnný přehled použitých mobilních fází uvádí tabulka 7.

Číslo MP	Složení mobilní fáze
1	Acetonitril : voda
2	Acetonitril : kyselina octová 0,1%
3	Acetonitril : kyselina octová 0,5%
4	Acetonitril : 50mM octan amonný pH = 3,8
5	Acetonitril : 50mM octan amonný pH = 4,8
6	Acetonitril : 50mM octan amonný pH = 5,8
7	Acetonitril : 50mM octan amonný pH = 6,8
8	Acetonitril : 50mM octan amonný pH = 7,8
9	Acetonitril : 50mM octan amonný pH = 8,8
10	Acetonitril : 50mM octan amonný pH = 9,8
11	Acetonitril : 100mM octan amonný pH = 9,8
12	Acetonitril : 10mM octan amonný pH = 9,8

Tabulka 7: Přehled a složení použitých mobilních fází

4.3 OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK

Na základě již publikovaných vědeckých článků a po následném vlastním ověření byla pro detekci biopterinu, neopterinu a jejich derivátů zvolena fluorescenční detekce s excitační vlnovou délkou 353 nm a emisní vlnovou délkou 438 nm. Tyto hodnoty byly zachovány po celou dobu analýzy.

Cílem práce bylo najít vhodné chromatografické podmínky, mezi které patří složení mobilní fáze a výběr analytické kolony.

Celkem byly vyzkoušeny tři kolony:

- 1 - ACQUITY UPLC BEH AMIDE 1,7 μm , 2,1 \times 100 mm
- 2 - ACQUITY UPLC BEH HILIC 1,7 μm , 2,1 \times 100 mm
- 3 - ACQUITY UPLC BEH GLYCAN 1,7 μm , 2,1 \times 100 mm

U každé kolony bylo testováno několik druhů mobilních fází, které vždy obsahovaly vodnou a organickou část. Organickou fází představoval ACN. Jako vodná složka byla používána voda a další látky lehce mísitelné s vodou (např. kyselina octová, octan amonný). Poměry a pH těchto mobilních fází byly různě měněny za účelem nalezení optimálních podmínek. Dále byly pozměňovány i objemy nástřiků vzorků. Nastavení excitační a vlnové délky, průtoková rychlost a teplota byly po celou dobu analýzy zachovány beze změny.

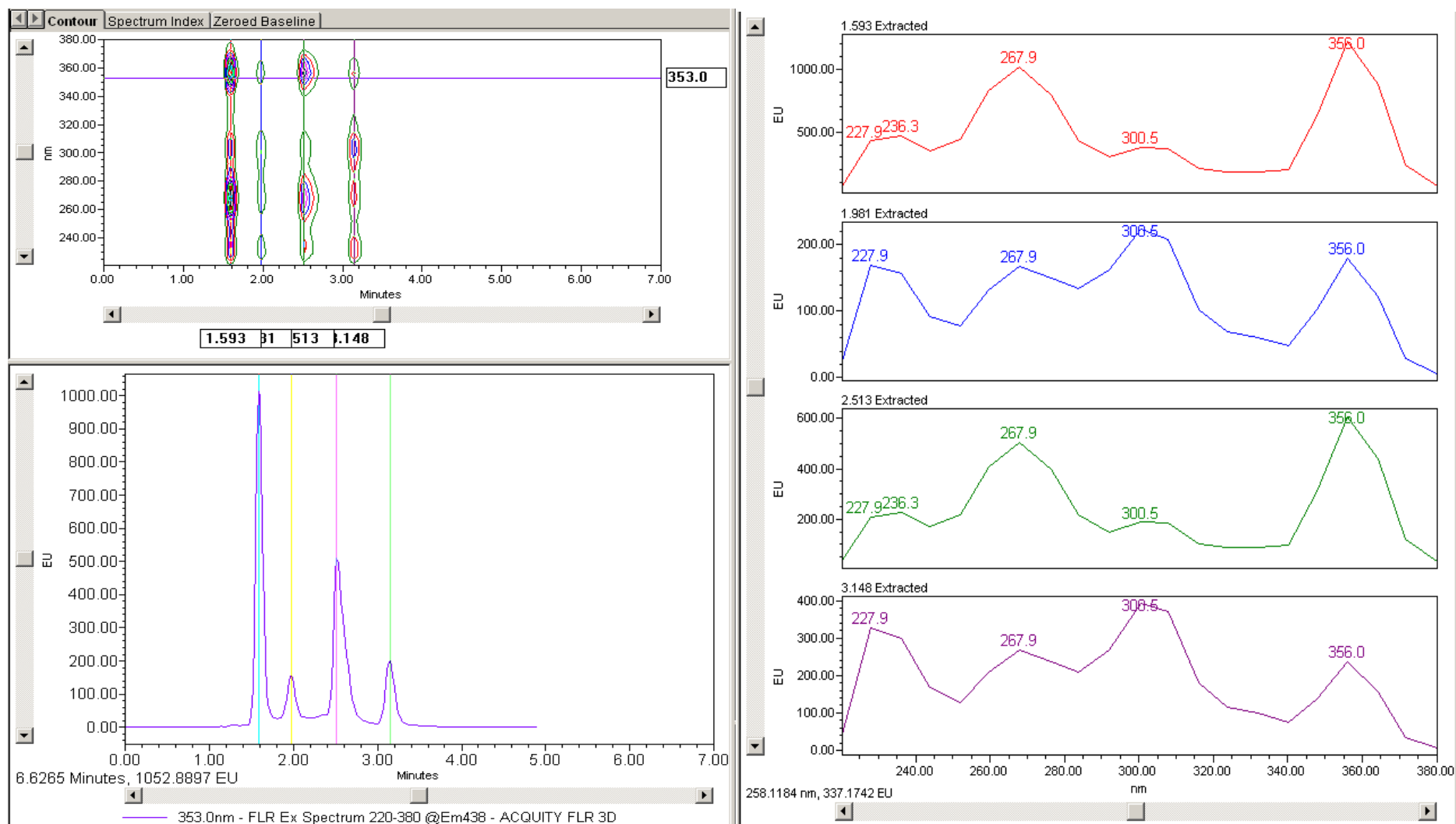
Během analýzy byla průtoková rychlost nastavena na 0,4 ml/min a teplota na koloně byla 30°C. Objem nástřiku se podle potřeby pohyboval v rozmezí 1 – 10 μl .

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

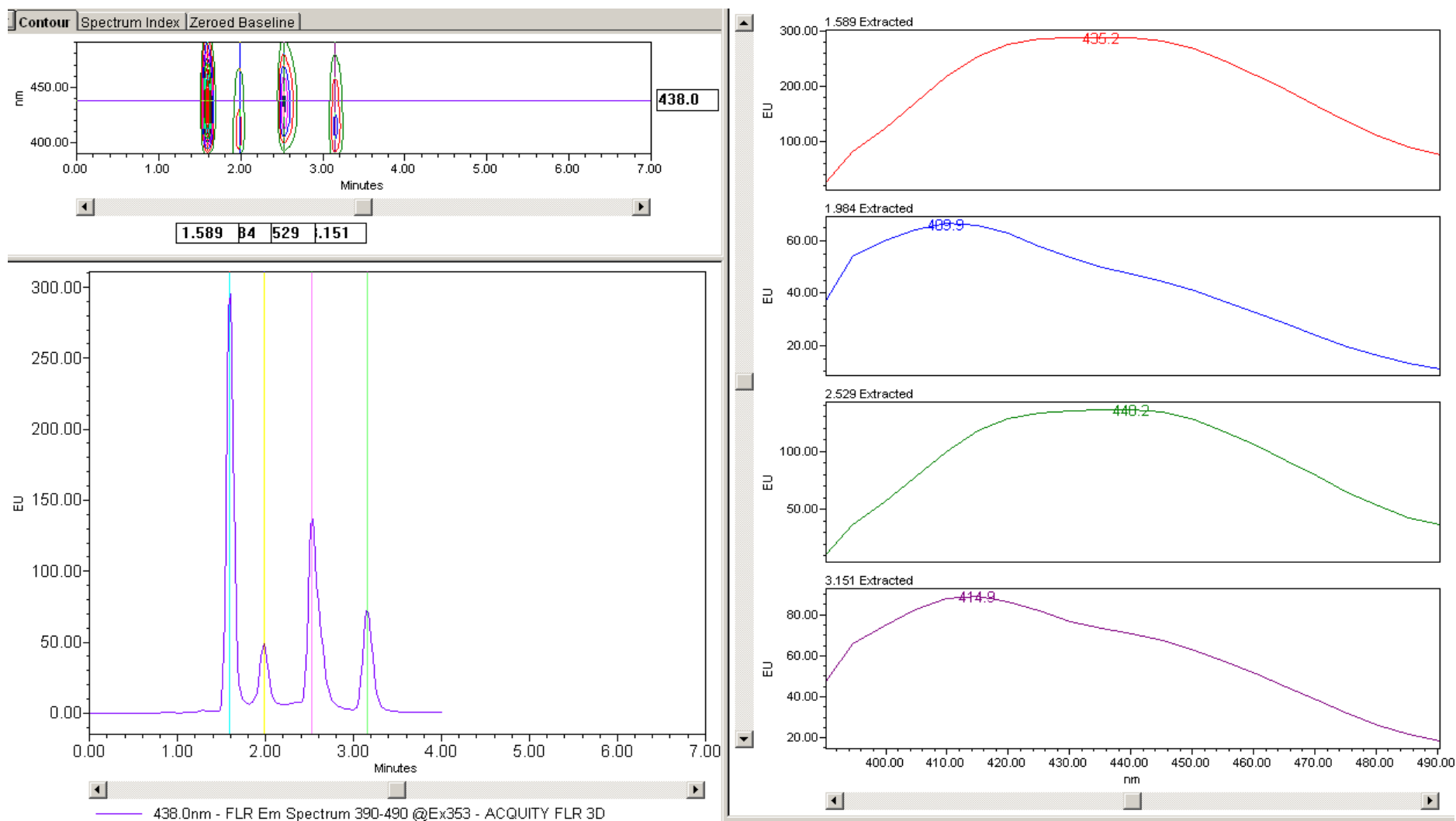
5.1 VÝVOJ HILIC METODY PRO SEPARACI

Na základě vlastního ověření byla pro detekci stanovovaných pteridinů zvolena fluorescenční detekce s excitační vlnovou délkou 353 nm a emisní vlnovou délkou 438 nm (obrázek 10 a 11). Měření bylo provedeno při pH 3,8, 6,8 a 9,8. Nebyl však zaznamenán výrazný rozdíl v závislosti na pH (asi proto, že velké procento mobilní fáze byl acetonitril).

Primárním cílem této práce bylo pomocí HILIC metody ověřit retenční chování biopterinu, neopterinu a jejich derivátů na třech předem zvolených kolonách a stanovit chromatografické podmínky, za kterých by docházelo k nejlepšímu oddělení jednotlivých derivátů.



Obrázek 10: Zjišťování excitační vlnové délky (BIO: $t_R = 1,6$ min, BH2: $t_R = 2,0$ min, NEO: $t_R = 2,5$ min, NH2: $t_R = 3,2$ min)



Obrázek 11: Zjišťování emisní vlnové délky (BIO: $t_R = 1,6$ min, BH2: $t_R = 2,0$ min, NEO: $t_R = 2,5$ min, NH2: $t_R = 3,2$ min)

5.1.1 Chromatografická kolona BEH AMIDE

Jako první byla testována chromatografická kolona BEH AMIDE ($2,1 \times 100$ mm, $1,7 \mu\text{m}$). Za reprezentativní představitele námi analyzovaných pterinů byly vybrány neopterin a biopterin. Jedním z důvodů takového výběru byla vyšší stabilita těchto látek oproti jejich derivátům. Objem nástřiku činil $10 \mu\text{l}$. Koncentrace roztoku byla 10^{-6} mol/l.

Cílem tohoto úvodního měření bylo zjistit retenční časy neopterinu a biopterinu za použití různých mobilních fází. Důraz byl kladen zejména na vliv pH pufru, koncentraci pufru (tvořícího vodnou složku mobilní fáze) a na vliv procentuálního obsahu organické a vodné složky v mobilní fázi. Výsledky jsou zaznamenány v tabulkách 8 a 9.

Ze získaných výsledků retenčních časů jednotlivých analytů a z naměřeného mrtvého retenčního času byl podle vzorce uvedeného v kapitole 3.3.1 vypočítán kapacitní faktor. Díky němu lze lépe porovnávat různé kolony. Hodnotit vlastnosti odlišných kolon pomocí retenčního času nelze, protože závisí na délce kolon a na dalších chromatografických podmínkách. Výsledky měření vyjádřené pomocí kapacitního faktoru pro BIO a NEO jsou uvedeny v tabulkách 10 a 11 a na obrázcích 12 a 13.

Vliv procentuální koncentrace vodné složky mobilní fáze na retenci stanovovaných látek byl v intervalu od 50% do 20% poměrně neměnný. Nalezené hodnoty k' se pohybovaly pro NEO v rozmezí 0,3 – 5 a pro BIO 0,3 – 3. Při dalším snižování koncentrace vodné složky MP (na 15% – 5%) došlo k prudkému nárůstu retence stanovovaných pteridinů. Velký rozdíl byl zaznamenán při změně z 10% koncentrace vodné složky MP na 5%, kdy byl naměřen téměř čtyřnásobný rozdíl. Se vzrůstajícím objemem ACN v mobilní fázi se postupně prodlužuje retenční čas. V rozmezí od 10% – 20% koncentrace vodné složky MP byly hodnoty kapacitního faktoru neopterinu oproti kapacitnímu faktoru biopterinu dvojnásobné. Rozdíl mezi hodnotou kapacitního faktoru 10mM AmAc ($k' = 13$) a 100mM AmAc ($k' = 26$) při pH 9,8 byl asi dvakrát takový.

Vlivem vzrůstajícího pH vzrůstala i doba retence. V rozmezí pH 3,8 - 8,8 byl rozdíl jen nepatrný. Většího prodloužení retence bylo dosaženo při pH 9,8. Obě koncentrace kyseliny octové (0,5% a 0,1%) měly na retenci stejný vliv (obrázek 12 a 13).

Na základě získaných výsledků byly zvoleny podmínky k testování separačních schopností chromatografické kolony BEH AMIDE, za kterých byla předpokládána co možná nejdokonalejší separace jednotlivých pterinů ze směsi.

Všechny kyselé modifikátory až do pH 3,8 vykazovaly nedostatečnou selektivitu a významné rozmývání píků derivátů, které neumožňovaly oddělení NH₂ od NEO a BH₂ od BIO. V rozmezí pH 4,8 – 7,8 se separace výrazně zlepšila. Všechny čtyři píky byly od sebe odděleny. Dalším zvýšením pH (8,8 – 9,8) již nedocházelo k lepší separaci jednotlivých derivátů. Navíc byla prodlužována doba analýzy (stejně jako při vysoké koncentraci ACN a vysoké molaritě), což bylo nežádoucí (obrázek 14).

S využitím 50mM octanu amonného při pH 6,8 a 15% koncentrací vodné složky mobilní fáze byl získán vyhovující tvar a separace pro všechny píky, stejně jako při pH 9,8 a 10% koncentraci vodné složky mobilní fáze (obrázek 14).

Konc. vodné složky MP	voda	10mM AmAc 9,8	50mM AmAc 3,8	50 mM AmAc 4,8	50 mM AmAc 5,8	50mM AmAc 6,8	50 mM AmAc 7,8	50mM AmAc 8,8	50mM AmAc 9,8	100mM AmAc 9,8	AcAc 0,5%	AcAc 0,1%
5%	11,198	14,191	11,640	14,294	14,294	14,036	14,239	14,611	18,757	-	11,212	11,113
10%	3,726	4,613	3,812	4,593	4,593	4,585	4,618	4,767	6,498	7,947	3,760	3,728
15%	2,129	2,460	2,144	2,437	2,437	2,450	2,465	2,559	3,417	3,984	2,152	2,129
20%	1,530	1,566	1,532	1,661	1,661	1,679	1,691	1,744	2,153	2,377	1,548	1,534
30%	1,068	0,901	1,063	1,096	1,096	1,103	1,111	1,140	1,173	1,269	1,078	1,073
40%	0,889	0,693	0,882	0,891	0,891	0,893	0,895	0,900	0,854	0,906	0,894	0,889
50%	0,744	0,606	0,795	0,797	0,797	0,799	0,797	0,779	0,721	0,760	0,803	0,801

Tabulka 8: Retenční časy biopterinu [min] v závislosti na koncentraci vodné složky mobilní fáze na koloně BEH AMIDE

AmAc – octan amonný, AcAc – kyselina octová

Konc. vodné složky MP	voda	10mM AmAc 9,8	50 mM AmAc 3,8	50 mM AmAc 4,8	50 mM AmAc 5,8	50mM AmAc 6,8	50 mM AmAc 7,8	50mM AmAc 8,8	50mM AmAc 9,8	100mM AmAc 9,8	AcAc 0,5%	AcAc 0,1%
5%	35,151	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35,946	-
10%	8,917	12,000	9,280	10,806	11,992	12,056	12,050	12,570	18,253	24,414	8,999	8,895
15%	4,007	5,012	4,068	4,473	4,895	4,921	4,965	5,210	7,442	9,132	4,060	4,011
20%	2,413	2,604	2,413	2,553	2,719	2,753	2,774	2,919	3,790	4,406	2,446	2,424
30%	1,357	1,089	1,353	1,372	1,400	1,425	1,435	1,483	1,547	1,720	1,372	1,362
40%	1,014	0,705	1,006	1,011	1,019	1,026	1,028	1,030	0,904	1,048	1,019	1,014
50%	0,813	0,621	0,852	0,853	0,855	0,855	0,857	0,828	0,756	0,793	0,861	0,859

Tabulka 9: Retenční časy neopterinu [min] v závislosti na koncentraci vodné složky mobilní fáze na koloně BEH AMIDE

AmAc – octan amonný, AcAc – kyselina octová

Konc. vodné složky MP	voda	10mM AmAc 9,8	50 mM AmAc 3,8	50 mM AmAc 4,8	50 mM AmAc 5,8	50mM AmAc 6,8	50 mM AmAc 7,8	50mM AmAc 8,8	50mM AmAc 9,8	100mM AmAc 9,8	AcAc 0,5%	AcAc 0,1%
5%	15,814	15,406	16,991	20,560	13,782	20,043	15,144	15,528	19,680	-	15,911	15,711
10%	4,835	4,738	4,984	6,267	3,755	6,243	4,604	4,764	6,708	7,830	4,903	4,834
15%	4,321	3,039	2,521	2,982	1,649	3,016	2,532	2,385	3,490	4,134	2,499	2,451
20%	2,983	1,266	1,375	1,675	0,841	1,686	1,440	1,517	2,093	2,410	1,580	1,561
30%	1,894	0,291	0,769	0,867	0,365	0,832	0,766	0,891	0,862	1,040	0,779	0,759
40%	1,369	0,097	0,497	0,539	0,483	0,481	0,474	0,178	0,405	0,505	0,441	0,439
50%	1,029	0,000	0,314	0,377	0,324	0,357	0,008	0,004	0,014	0,127	0,287	0,271

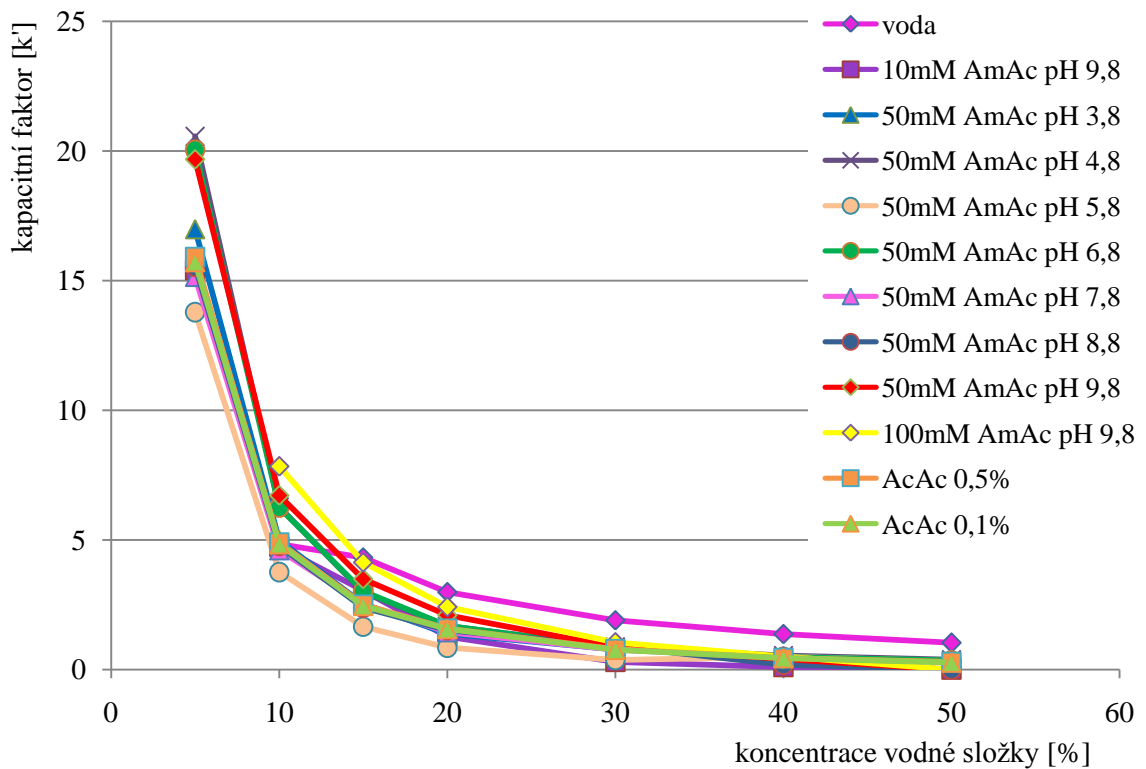
Tabulka 10: Kapacitní faktor BIO v závislosti na složení mobilní fáze pro kolonu BEH AMIDE

AmAc – octan amonný, AcAc – kyselina octová

Konc. vodné složky MP	voda	10mM AmAc 9,8	50 mM AmAc 3,8	50 mM AmAc 4,8	50 mM AmAc 5,8	50mM AmAc 6,8	50 mM AmAc 7,8	50mM AmAc 8,8	50mM AmAc 9,8	100mM AmAc 9,8	AcAc 0,5%	AcAc 0,1%
5%	51,779	-	-	-	-	-	-	-	-	-	53,217	-
10%	12,966	13,925	13,568	16,098	11,414	18,046	13,624	14,200	20,652	26,127	13,127	12,920
15%	9,018	7,230	5,680	6,309	4,321	7,067	6,113	5,892	8,779	10,768	5,602	5,501
20%	5,284	2,768	2,741	3,111	2,014	3,405	3,003	3,212	4,445	5,321	3,077	3,047
30%	2,678	0,560	1,251	1,337	0,743	1,367	1,281	1,459	1,456	1,765	1,263	1,233
40%	1,703	0,116	0,708	0,746	0,696	0,701	0,694	0,348	0,487	0,741	0,643	0,641
50%	1,218	0,025	0,408	0,473	0,420	0,452	0,071	0,067	0,031	0,037	0,380	0,363

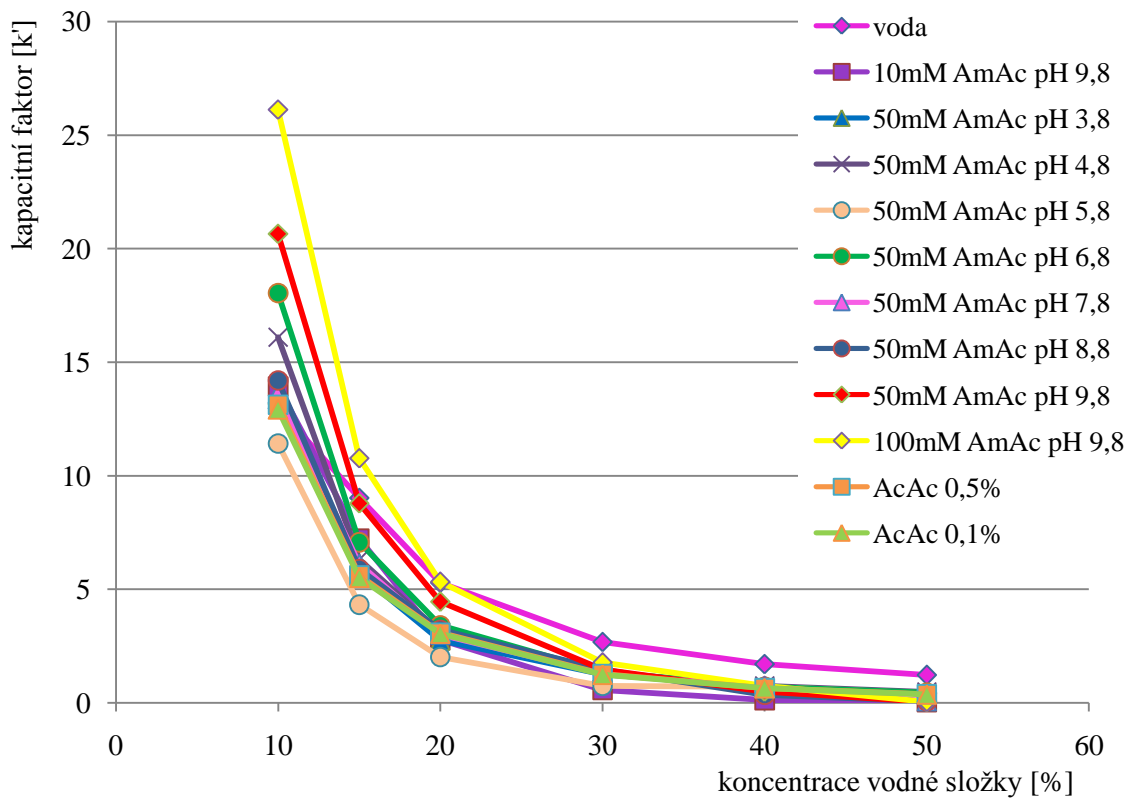
Tabulka 11: Kapacitní faktor NEO v závislosti na složení mobilní fáze pro kolonu BEH AMIDE

AmAc – octan amonný, AcAc – kyselina octová



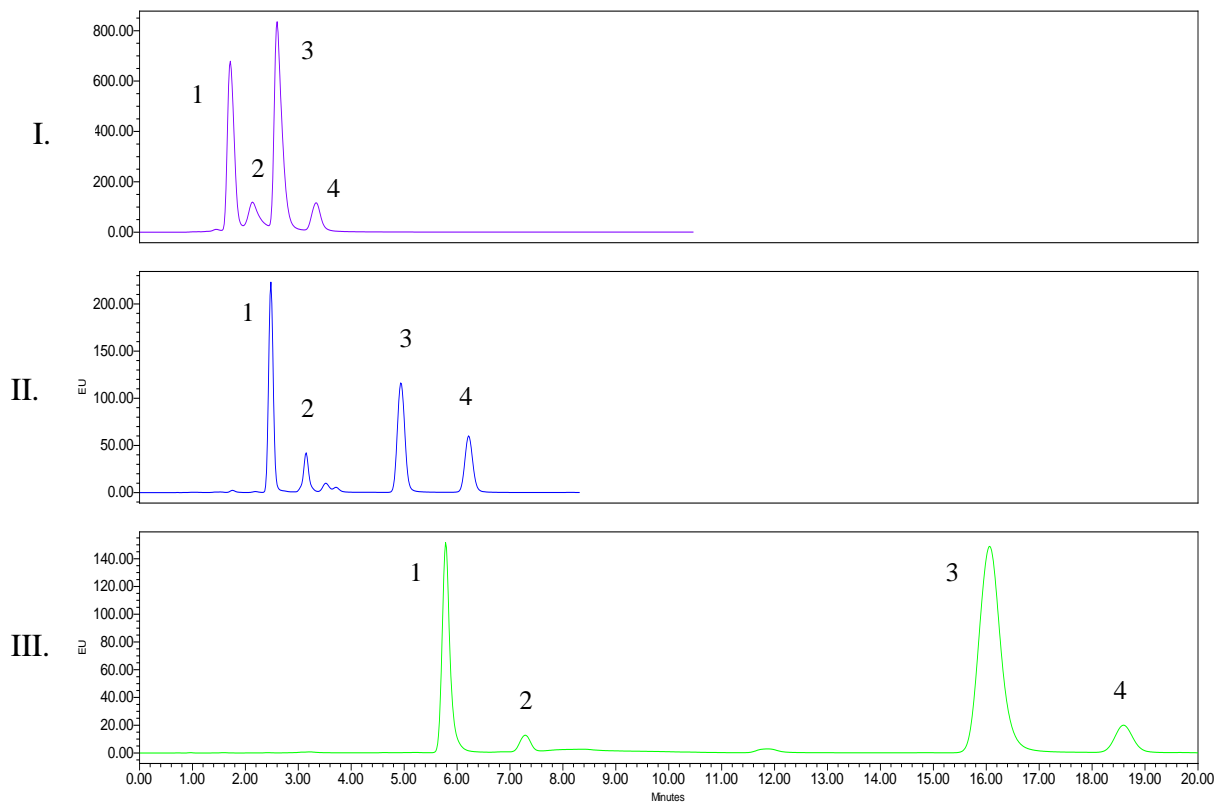
Obrázek 12: Kapacitní faktor BIO v závislosti na složení mobilní fáze pro BEH AMIDE

AmAc – octan amonný, AcAc – kyselina octová



Obrázek 13: Kapacitní faktor NEO v závislosti na složení mobilní fáze pro BEH AMIDE

AmAc – octan amonný, AcAc – kyselina octová



Obrázek 14: Vliv složení mobilní fáze a pH na délku separace.

I. ACN : 50mM AmAc pH 3,8 (80:20)

II. ACN : 50mM AmAc pH 6,8 (85:15)

III. ACN : 50mM AmAc pH 9,8 (90:10)

(1) BIO, (2) BH2, (3) NEO, (4) NH2

5.1.2 Chromatografická kolona BEH HILIC

Druhou testovanou chromatografickou kolonou byla kolona BEH HILIC (2,1 × 100 mm, 1,7 μm). Stejně jako u kolony BEH AMIDE byly nastříkovány vzorky NEO a BIO o koncentraci 10⁻⁶ mol/l. Cílem tohoto měření bylo zjistit retenční časy pterinů za použití různých mobilních fází.

Jak je patrné z tabulek retenčních časů (tabulka 12, 13), vliv procentuální koncentrace vodné složky mobilní fáze na retenci stanovovaných látek byl v intervalu od 50% do 15% pro BIO i NEO přibližně stejný a nevýznamný. Nalezené hodnoty kapacitních faktorů byly nízké a velice podobné. Pohybovaly se v rozmezí od 0,2 – 3,0 (tabulka 14, 15 a obrázek 15, 16). Při dalším snižování koncentrace vodné složky MP (z 10% na 5%) nedošlo k tak výraznému nárůstu retence stanovovaných pteridinů jako u kolony BEH AMIDE. Retence se prodloužila dvojnásobně.

Vliv pH a molarity pufrů byl podobný jako u předcházející kolony. Důsledkem vzrůstajícího pH vzrůstala i doba retenčního času. V rozmezí pH 3,8 – 8,8 docházelo k nepatrnému zvyšování retence. Výraznější rozdíl byl zaznamenán u 50mM a 100mM AmAc při pH 9,8. Retenční časy obou koncentrací kyseliny octové byly opět téměř stejné.

Následně byly hledány nejvhodnější podmínky pro separaci všech čtyř pteridinů. BEH HILIC, ve srovnání s ostatními zkoušenými kolonami, neposkytovala pro směs pteridinů dostatečnou schopnost separace. Za zkoumaných podmínek došlo k separaci pouze NEO a BIO, zatímco deriváty pteridinů (BH₂, NH₂) nebyly od BIO a NEO odděleny vůbec, a to za žádných podmínek.

Na koloně BEH HILIC byl vyzkoušen negativní vliv kyselého pH na tvar píků. Vznikající píky byly velmi široké a chvostující (obrázek 17). Ke zlepšení separace došlo při zvýšení pH a zároveň při použití vysokého procentuálního obsahu ACN. K dostatečné separaci jednotlivých pteridinů ale nedošlo (obrázek 18).

Tato kolona nebyla shledána jako optimální pro separaci oxidovaných a redukovaných forem pteridinů pro nedostatečnou selektivitu a špatný tvar píků.

Konc. vodné složky MP	voda	10 mM AmAc 9,8	50 mM AmAc 3,8	50 mM AmAc 4,8	50mM AmAc 5,8	50 mM AmAc 6,8	50mM AmAc 7,8	50mM AmAc 8,8	50mM AmAc 9,8	100mM AmAc 9,8	AcAc 0,5%	AcAc 0,1%
5%	2,598	3,752	2,592	3,058	3,476	3,719	3,489	3,695	5,419	7,902	2,409	2,442
10%	1,414	1,898	1,441	1,662	1,816	1,826	1,844	1,921	2,559	3,421	1,409	1,408
15%	1,079	1,310	1,140	1,222	1,298	1,301	1,317	1,361	1,726	2,096	1,137	1,136
20%	0,784	0,972	1,013	1,048	1,094	1,095	1,103	1,136	1,315	1,504	1,018	1,016
30%	0,731	0,771	0,897	0,903	0,920	0,923	0,925	0,937	0,931	1,032	0,899	0,899
40%	0,629	0,671	0,840	0,841	0,847	0,850	0,847	0,842	0,785	0,850	0,843	0,844
50%	0,533	0,616	0,813	0,811	0,814	0,815	0,811	0,790	0,726	0,772	0,815	0,815

Tabulka 12: Retenční časy biopterinu [min] v závislosti na koncentraci vodné složky mobilní fáze na koloně BEH HILIC

AmAc – octan amonný, AcAc – kyselina octová

Konc. vodné složky MP	voda	10 mM AmAc 9,8	50 mM AmAc 3,8	50 mM AmAc 4,8	50mM AmAc 5,8	50 mM AmAc 6,8	50mM AmAc 7,8	50mM AmAc 8,8	50mM AmAc 9,8	100mM AmAc 9,8	AcAc 0,5%	AcAc 0,1%
5%	5,060	6,834	4,216	5,210	6,053	6,248	6,206	6,307	10,205	16,634	3,516	3,619
10%	1,811	2,646	1,807	2,184	2,500	2,486	2,552	2,698	3,967	5,169	1,712	1,718
15%	1,215	1,503	1,289	1,427	1,571	1,566	1,592	1,671	2,264	2,789	1,273	1,273
20%	0,786	0,980	1,091	1,146	1,224	1,227	1,239	1,290	1,493	1,784	1,090	1,089
30%	0,731	0,771	0,920	0,931	0,956	0,961	0,963	0,981	0,983	1,100	0,924	0,923
40%	0,621	0,669	0,844	0,846	0,855	0,858	0,857	0,851	0,798	0,875	0,847	0,847
50%	0,524	0,613	0,808	0,809	0,810	0,814	0,811	0,789	0,728	0,778	0,810	0,812

Tabulka 13: Retenční časy neopterinu [min] v závislosti na koncentraci vodné složky mobilní fáze na koloně BEH HILIC

AmAc – octan amonný, AcAc – kyselina octová

Konc. vodné složky MP	voda	10 mM AmAc 9,8	50 mM AmAc 3,8	50 mM AmAc 4,8	50mM AmAc 5,8	50 mM AmAc 6,8	50mM AmAc 7,8	50mM AmAc 8,8	50mM AmAc 9,8	100mM AmAc 9,8	AcAc 0,5%	AcAc 0,1%
5%	3,041	6,342	3,947	3,816	3,966	4,406	4,294	4,118	6,225	9,578	2,088	2,143
10%	2,863	2,788	1,809	1,822	1,887	1,955	1,969	2,035	2,747	3,592	0,786	0,789
15%	1,854	1,620	1,131	1,043	1,067	1,102	1,131	1,171	1,710	1,848	0,456	0,485
20%	1,036	0,956	0,806	0,707	0,726	0,738	0,759	0,809	1,118	1,146	0,322	0,328
30%	0,837	0,545	0,505	0,424	0,422	0,449	0,457	0,497	0,539	0,396	0,169	0,169
40%	0,573	0,339	0,357	0,292	0,293	0,316	0,326	0,349	0,308	0,322	0,088	0,095
50%	0,316	0,232	0,259	0,210	0,213	0,242	0,252	0,264	0,212	0,197	0,020	0,026

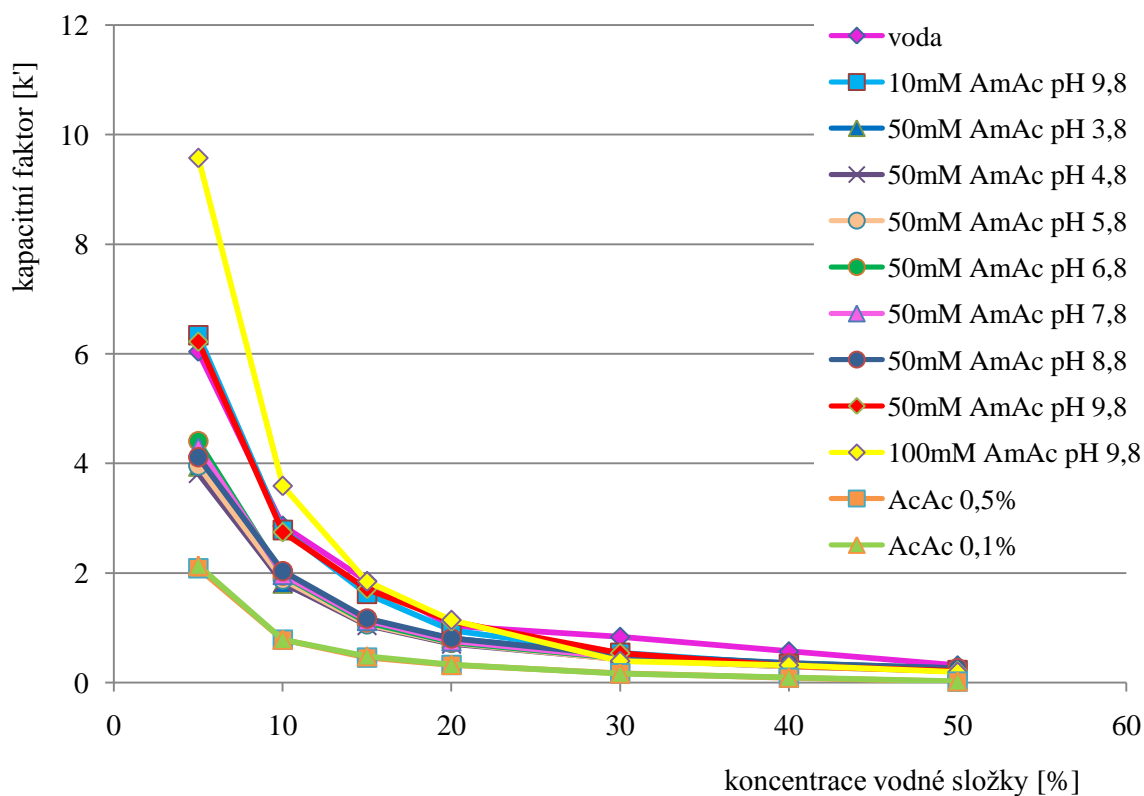
Tabulka 14: Kapacitní faktor BIO v závislosti na složení mobilní fáze pro kolonu BEH HILIC

AmAc – octan amonný, AcAc – kyselina octová

Konc. vodné složky MP	voda	10 mM AmAc 9,8	50 mM AmAc 3,8	50 mM AmAc 4,8	50mM AmAc 5,8	50 mM AmAc 6,8	50mM AmAc 7,8	50mM AmAc 8,8	50mM AmAc 9,8	100mM AmAc 9,8	AcAc 0,5%	AcAc 0,1%
5%	12,713	12,374	7,046	7,205	7,647	8,081	8,417	7,735	12,607	21,268	3,508	3,658
10%	3,948	4,281	2,522	2,708	2,975	3,023	3,110	3,262	4,808	5,938	1,170	1,183
15%	2,214	2,006	1,409	1,386	1,502	1,530	1,576	1,665	2,554	2,789	0,630	0,664
20%	1,042	0,972	0,945	0,866	0,931	0,948	0,976	1,054	1,404	1,545	0,416	0,424
30%	0,837	0,545	0,544	0,468	0,478	0,509	0,517	0,567	0,625	0,488	0,202	0,200
40%	0,553	0,335	0,363	0,300	0,305	0,328	0,341	0,364	0,330	0,361	0,093	0,099
50%	0,294	0,226	0,251	0,207	0,207	0,421	0,252	0,262	0,215	0,206	0,014	0,023

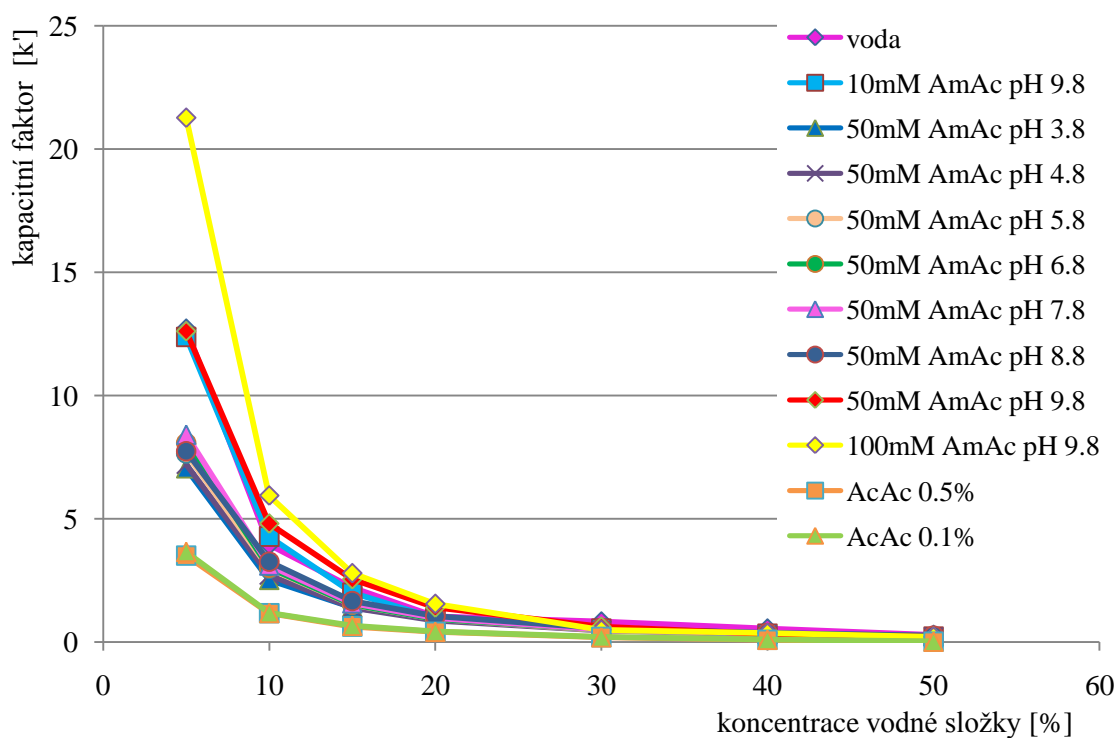
Tabulka 15: Kapacitní faktor NEO v závislosti na složení mobilní fáze pro kolonu BEH HILIC

AmAc – octan amonný, AcAc – kyselina octová



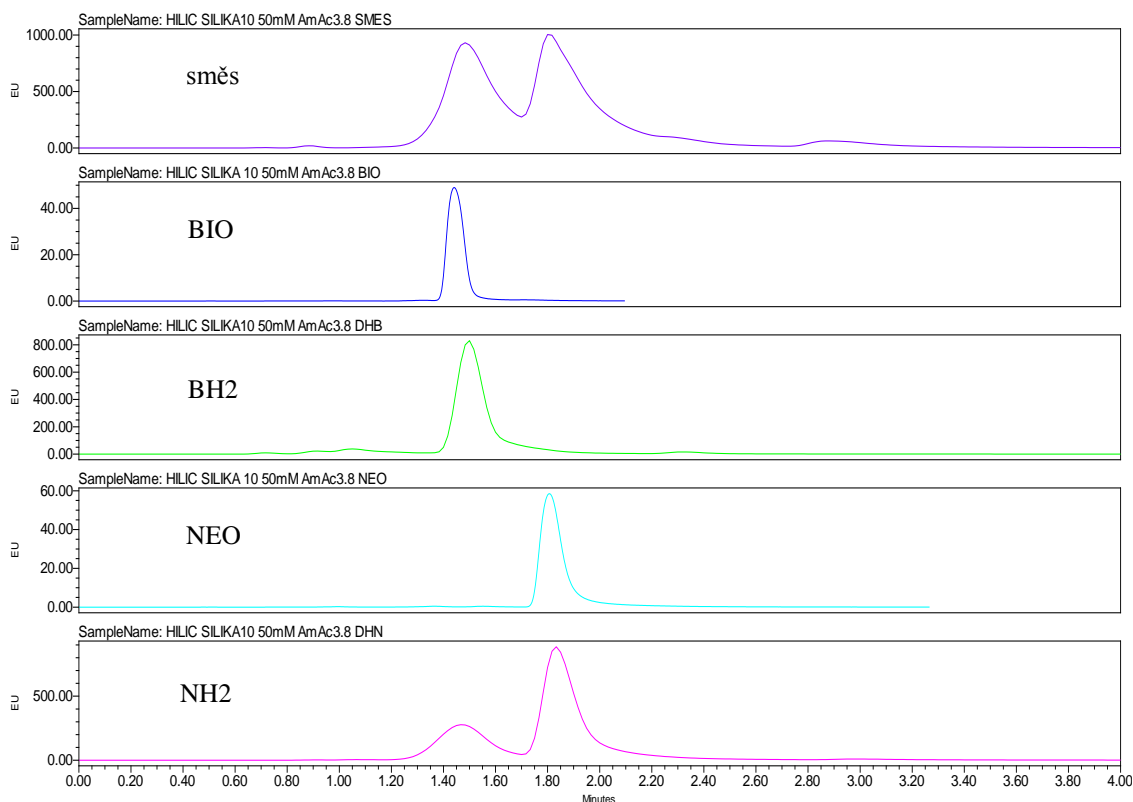
Obrázek 15: Kapacitní faktor BIO v závislosti na složení mobilní fáze pro BEH HILIC

AmAc – octan amonný, AcAc – kyselina octová

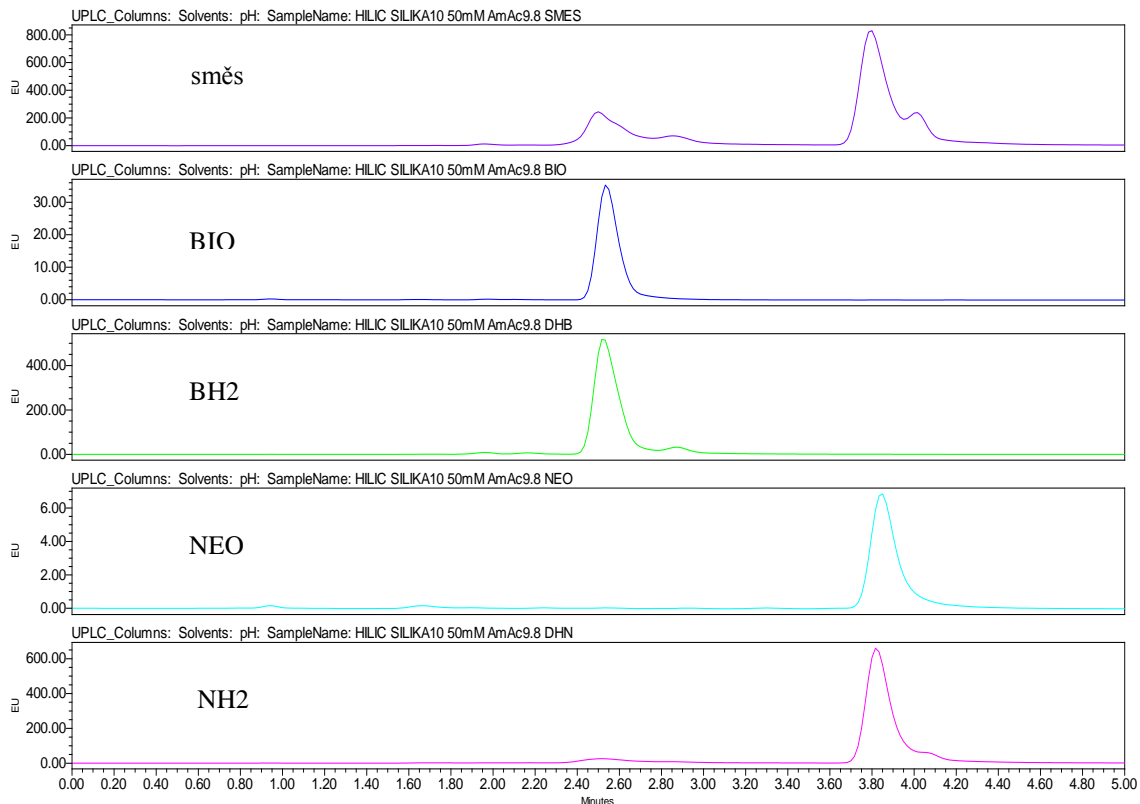


Obrázek 16: Kapacitní faktor NEO v závislosti na složení mobilní fáze pro BEH HILIC

AmAc – octan amonný, AcAc – kyselina octová



Obrázek 17: Separace směsi pteridinů na koloně BEH HILIC s MP ACN:50mM AmAc pH 3,8 (90:10)



Obrázek 18: Separace směsi pteridinů na koloně BEH HILIC s MP ACN:50mM AmAc pH 9,8 (90:10)

5.1.3 Chromatografická kolona BEH GLYCAN

Poslední testovanou kolonou byla kolona BEH GLYCAN (2,1 × 100 mm, 1,7 μm). Opět byly nejdříve nastříkovány vzorky NEO a BIO o koncentraci 10⁻⁶ mol/l. Účelem tohoto měření bylo zjistit retenční časy pteridinů za použití různých mobilních fází.

Jak je patrné z tabulek 16 – 19 a obrázků 19 a 20, retenční časy mírně stoupaly s klesajícím obsahem vodné složky v mobilní fázi (50% – 15%). Znatelnější rozdíl byl zaznamenán při obsahu 10% vodné složky. Při 5% obsahu došlo k téměř trojnásobnému zvýšení retenčního času. Retence BIO při této koncentraci trvala i 20 minut. NEO při 5% koncentraci vodné složky v MP nebyl měřen, protože již při 10% koncentraci vodné složky byl naměřen retenční čas přes 20 minut.

Vliv pH a molarity pufru byl podobný jako u předcházejících kolon. V rozmezí pH 3,8 – 8,8 docházelo jen k nepatrnému zvyšování retenčního času. Větší rozdíl byl zaznamenán u 50mM AmAc při pH 9,8 a ještě větší u 100mM AmAc při pH 9,8. Retenční časy obou koncentrací kyseliny octové byly opět téměř stejné a v porovnání s ostatními aditivy nižší.

Následně byly hledány nejvhodnější podmínky pro separaci směsi pteridinů. Protože je tato kolona chemicky stejná s kolonou BEH AMIDE, svými vlastnostmi se podobají. Separační účinnost kolony BEH GLYKAN byla však v porovnání s BEH AMIDE nedostatečná. Za stanovených podmínek došlo k žádoucí separaci jednotlivých píků pouze při použití 50mM AmAc při pH 6,8 a 20% koncentrace vodné složky mobilní fáze. V ostatních případech došlo pouze k rozdělení píků BIO a NEO. Píky redukovaných forem pteridinů nebyly většinou odseparované od BIO a NEO. Například pomocí kolony BEH AMIDE za použití 50mM AmAc pH 3,8 a ACN (20:80) byly všechny čtyři pteridiny separované. Na koloně BEH GLYKAN se však páry BIO-BH2 a NEO-NH2 od sebe vůbec neseperoaly (obrázek 21). Při nástřiku směsi těchto pteridinů byly eluovány místo čtyř píků jen píky dva. V tomto případě výrazněji nepomohlo ani výrazné zvýšení pH či zvýšení poměru ACN v mobilní fázi. Vzdálenosti mezi píky se sice zvětšily, ale neoddelily se až na základní linii. Píky byly v základu široké a asymetrické (obrázek 22).

Pouze s využitím 50mM octanu amonného při pH 6,8 a 20% koncentrací vodné složky mobilní fáze byl získán vyhovující tvar a separace pro všechny píky (obrázek 23).

Konc. vodné složky MP	voda	10 mM AmAc 9,8	50 mM AmAc 3,8	50 mM AmAc 4,8	50mM AmAc 5,8	50 mM AmAc 6,8	50mM AmAc 7,8	50mM AmAc 8,8	50mM AmAc 9,8	100mM AmAc 9,8	AcAc 0,5%	AcAc 0,1%
5%	11,703	14,339	12,013	13,904	15,093	14,557	14,526	14,869	18,060	-	12,653	12,097
10%	3,786	4,679	3,896	4,401	4,839	4,675	4,692	4,845	6,149	7,426	4,026	3,905
15%	2,090	2,510	2,166	2,313	2,520	2,475	2,486	2,583	3,278	3,797	2,236	2,189
20%	1,456	1,629	1,535	1,587	1,693	1,684	1,691	1,747	2,101	2,354	1,587	1,556
30%	0,960	0,937	1,051	1,063	1,093	1,093	1,099	1,129	1,156	1,267	1,085	1,073
40%	0,744	0,710	0,867	0,870	0,879	0,881	0,882	0,887	0,843	0,904	0,890	0,885
50%	0,585	0,610	0,778	0,779	0,782	0,780	0,779	0,766	0,708	0,753	0,794	0,795

Tabulka 16: Retenční časy biopterinu [min] v závislosti na koncentraci vodné složky mobilní fáze na koloně BEH GLYKAN

AmAc – octan amonný, AcAc – kyselina octová

Konc. vodné složky MP	voda	10 mM AmAc 9,8	50 mM AmAc 3,8	50 mM AmAc 4,8	50mM AmAc 5,8	50 mM AmAc 6,8	50mM AmAc 7,8	50mM AmAc 8,8	50mM AmAc 9,8	100mM AmAc 9,8	AcAc 0,5%	AcAc 0,1%
5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10%	9,129	11,968	9,544	11,179	12,929	12,274	12,246	12,846	17,131	22,471	9,648	9,390
15%	3,948	5,080	4,144	4,566	5,174	5,017	5,024	5,303	7,089	8,581	4,258	4,158
20%	2,278	2,742	2,447	2,577	2,818	2,780	2,792	2,953	3,686	4,274	2,541	2,481
30%	1,196	1,158	1,350	1,366	1,414	1,425	1,428	1,481	1,539	1,718	1,392	1,375
40%	0,827	0,754	0,994	0,998	1,013	1,016	1,016	1,018	0,931	1,055	1,020	1,015
50%	0,613	0,627	0,837	0,839	0,841	0,840	0,840	0,812	0,741	0,784	0,855	0,855

Tabulka 17: Retenční časy neopterinu [min] v závislosti na koncentraci vodné složky mobilní fáze na koloně BEH GLYKAN

AmAc – octan amonný, AcAc – kyselina octová

Konc. vodné složky MP	voda	10 mM AmAc 9,8	50 mM AmAc 3,8	50 mM AmAc 4,8	50mM AmAc 5,8	50 mM AmAc 6,8	50mM AmAc 7,8	50mM AmAc 8,8	50mM AmAc 9,8	100mM AmAc 9,8	AcAc 0,5%	AcAc 0,1%
5%	30,802	15,889	13,200	15,205	16,289	15,829	15,754	16,071	34,342	-	14,009	13,350
10%	9,879	6,068	3,963	4,515	4,945	4,772	4,814	4,959	8,563	7,420	4,404	3,968
15%	4,971	2,809	2,332	2,521	2,812	2,739	2,562	2,771	4,203	4,471	2,076	2,028
20%	3,136	1,994	1,452	1,376	1,666	1,752	1,786	1,873	2,537	2,477	1,519	1,506
30%	1,468	0,716	0,698	0,731	0,807	0,807	0,808	0,860	0,901	1,112	0,756	0,736
40%	0,943	0,305	0,421	0,422	0,492	0,503	0,503	0,506	0,434	0,553	0,481	0,473
50%	0,531	0,164	0,227	0,221	0,218	0,311	0,360	0,281	0,184	0,285	-0,006	0,000

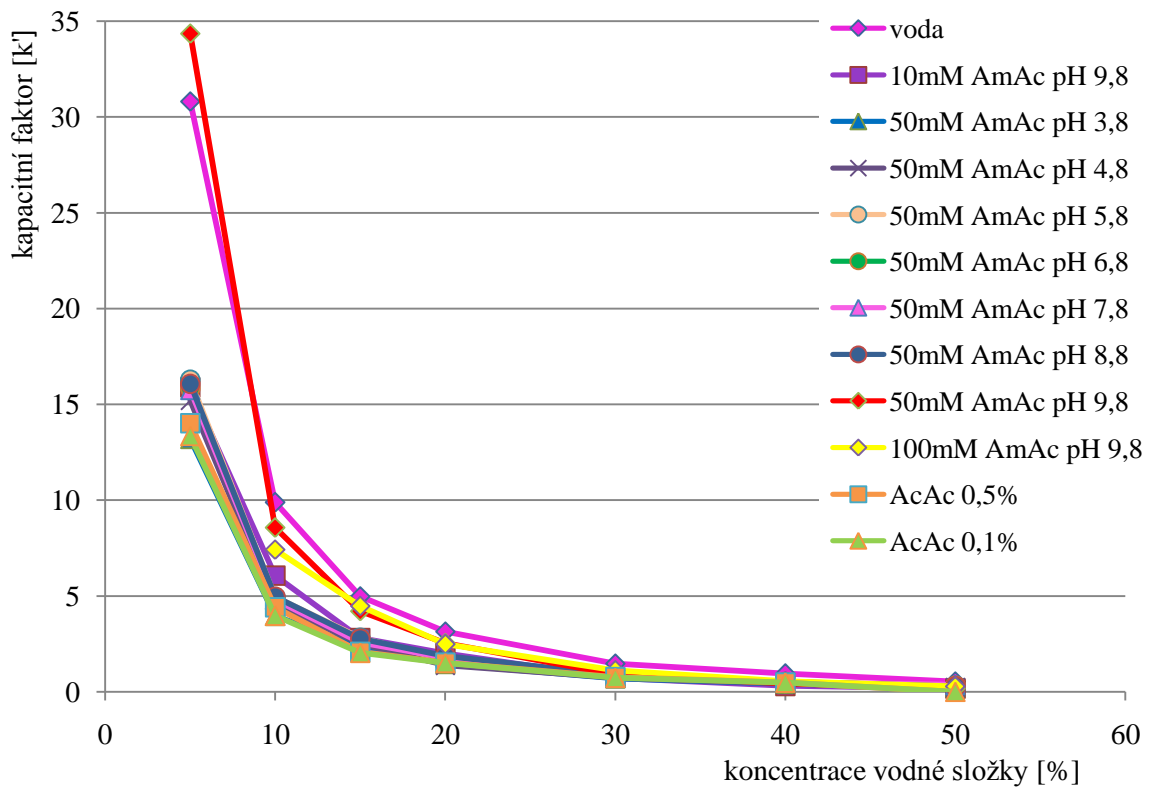
Tabulka 18: Kapacitní faktor BIO v závislosti na složení mobilní fáze pro kolonu BEH GLYKAN

AmAc – octan amonný, AcAc – kyselina octová

Konc. vodné složky MP	voda	10 mM AmAc 9,8	50 mM AmAc 3,8	50 mM AmAc 4,8	50mM AmAc 5,8	50 mM AmAc 6,8	50mM AmAc 7,8	50mM AmAc 8,8	50mM AmAc 9,8	100mM AmAc 9,8	AcAc 0,5%	AcAc 0,1%
5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10%	25,233	17,079	11,158	13,009	14,883	14,153	14,175	14,801	25,642	24,477	11,950	10,947
15%	10,280	6,709	5,375	5,950	6,828	6,579	6,198	6,742	10,252	11,365	4,857	4,751
20%	5,472	4,040	2,909	2,858	3,438	3,542	3,600	3,857	5,205	5,313	3,033	2,995
30%	2,075	1,121	1,181	1,225	1,337	1,355	1,349	1,440	1,531	1,863	1,252	1,225
40%	1,159	0,386	0,630	0,631	0,720	0,734	0,731	0,728	0,583	0,813	0,697	0,689
50%	0,605	0,197	0,320	0,315	0,310	0,412	0,466	0,358	0,239	0,338	0,070	0,075

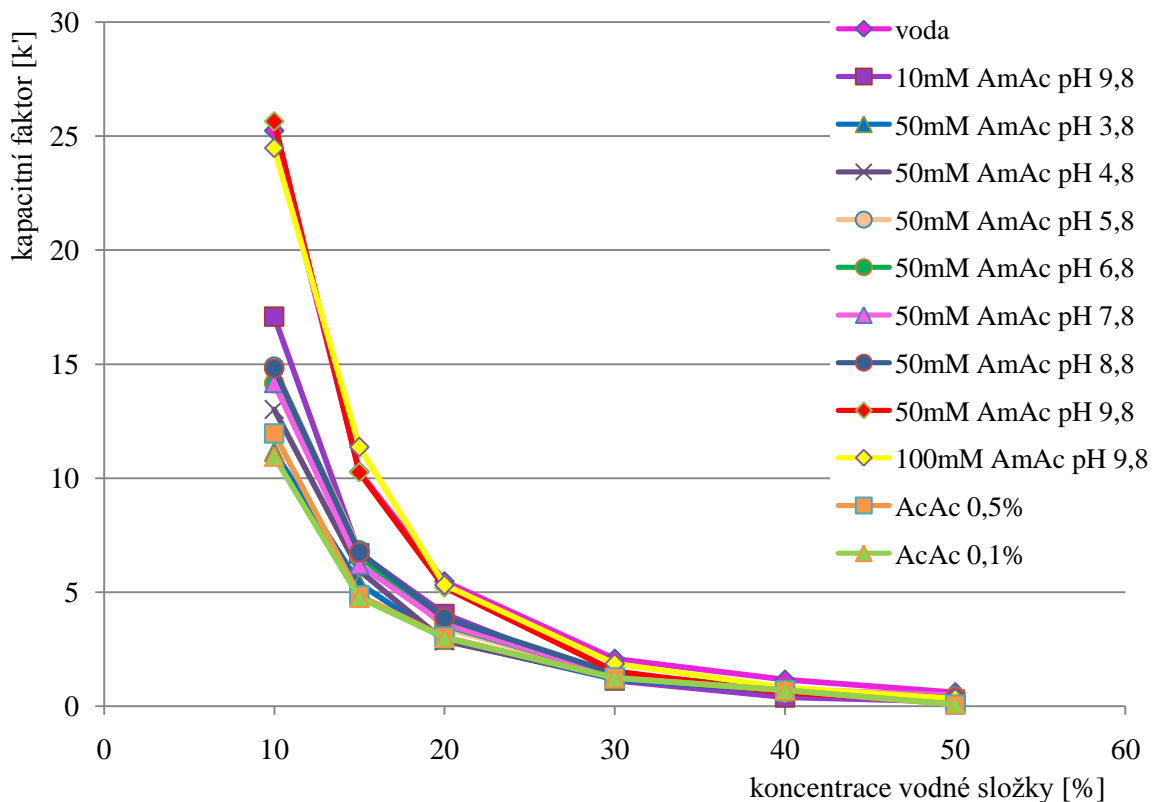
Tabulka 19: Kapacitní faktor NEO v závislosti na složení mobilní fáze pro kolonu BEH GLYKAN

AmAc – octan amonný, AcAc – kyselina octová



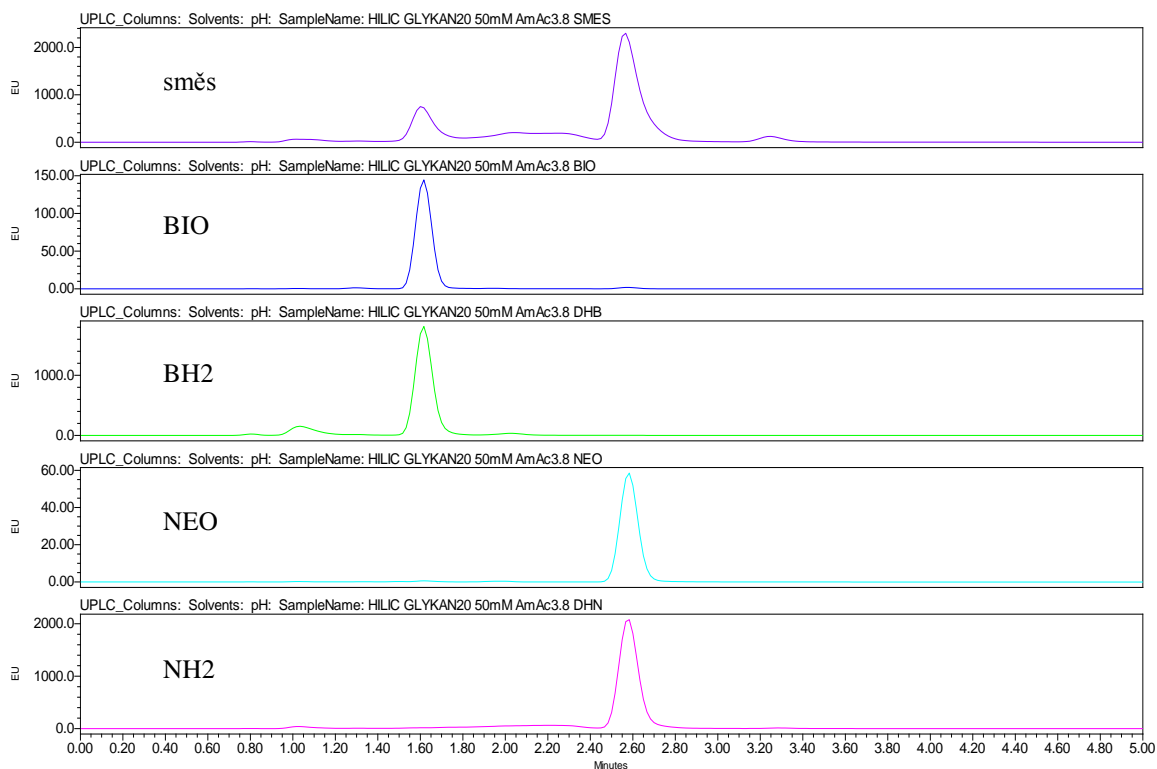
Obrázek 19: Kapacitní faktor BIO v závislosti na složení mobilní fáze pro BEH GLYCAN

AmAc – octan amonný, AcAc – kyselina octová

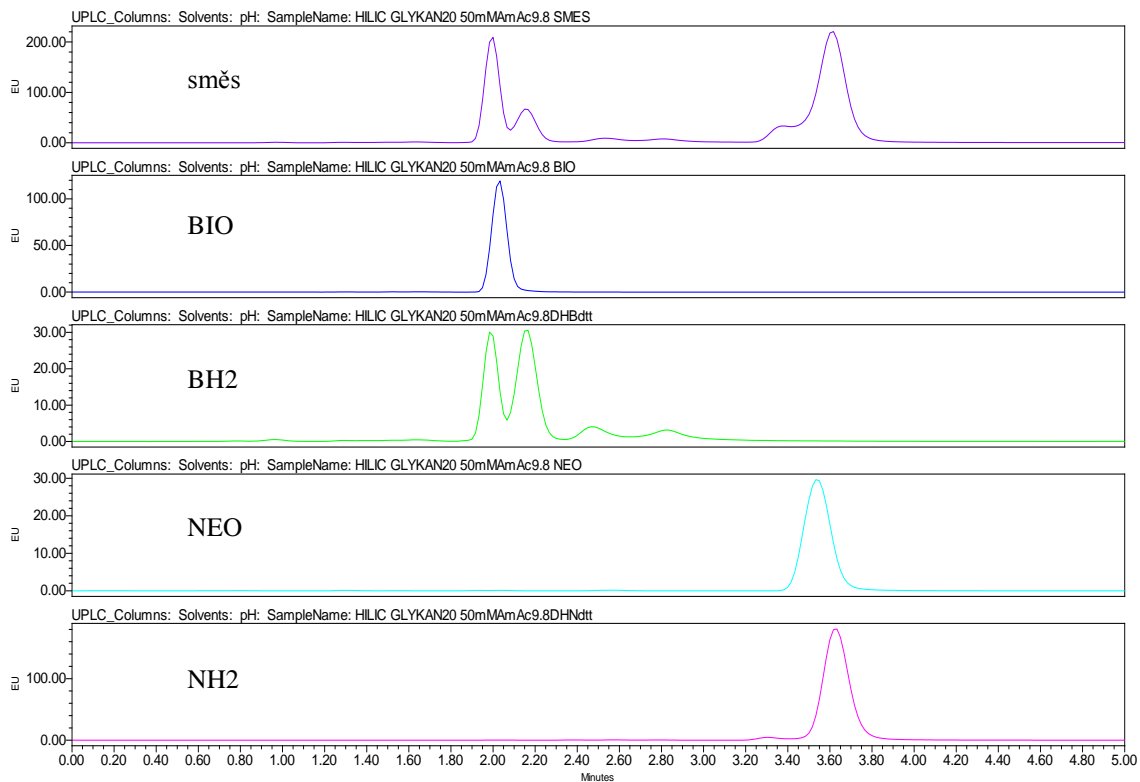


Obrázek 20: Kapacitní faktor NEO v závislosti na složení mobilní fáze pro BEH GLYCAN

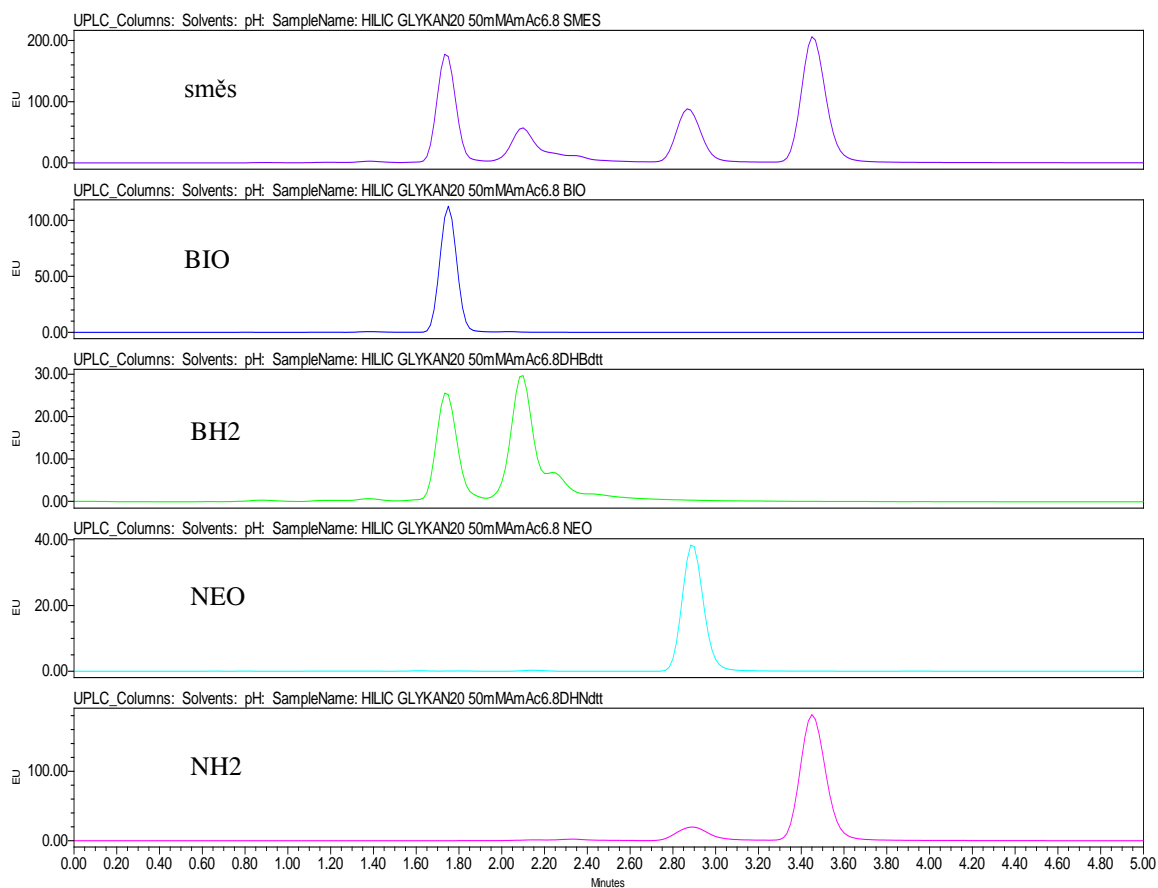
AmAc – octan amonný, AcAc – kyselina octová



Obrázek 21: Separace směsi pteridinů na koloně BEH GLYKAN s MP ACN:50mM AmAc pH 3,8 (80:20)



Obrázek 22 Separace směsi pteridinů na koloně BEH GLYKAN s MP ACN:50mM AmAc pH 9,8 (80:20)



Obrázek 23: Separace směsi pteridinů na koloně BEH GLYCAN s MP ACN:50mM AmAc pH 6,8 (80:20)

5.1.4 Hodnocení zpětného tlaku v chromatografickém systému

Během jednotlivých měření byl zaznamenáván tlak na koloně. Z tabulek 20 - 22 je patrné, že nejnižší tlak byl zaznamenán na koloně BEH HILIC, po ní následovala kolona BEH AMIDE a nejvyšší hodnoty byly zaznamenány u kolony BEH GLYKAN.

V souladu s očekáváním tlak klesal s rostoucí koncentrací ACN v mobilní fázi. Rozdíl mezi 5% a 50% koncentrací vodné složky mobilní fáze byl až dvojnásobný. Při změně pH se hodnota tlaku výrazněji neměnila.

Kolona BEH GLYKAN je amidová stacionární fáze první generace, zatímco kolona BEH AMIDE patří do novější druhé generace, u které byl pomocí nových technologií snížen zpětný tlak. Tato skutečnost byla během měření potvrzena.

Rozdíly tlaků v rámci jednotlivých kolon však nebyly výrazné. Odchyly se pohybovaly v řádu několika stovek PSI.

Konc. vodné složky MP	voda	10 mM AmAc 9,8	50 mM AmAc 3,8	50 mM AmAc 4,8	50mM AmAc 5,8	50 mM AmAc 6,8
5%	3189	3050	2990	3004	3001	2974
10%	3466	3404	3244	3271	3277	3234
15%	3822	3636	3556	3598	3621	3556
20%	4162	3978	388	3948	3958	3909
30%	4895	4718	457	4676	4696	4633
40%	5564	5423	522	5358	5400	5310
50%	6148	6030	5819	5988	5985	5881

Konc. vodné složky MP	50 mM AmAc 7,8	50mM AmAc 8,8	50mM AmAc 9,8	100mM AmAc 9,8	AcAc 0,5%	AcAc 0,1%
5%	3050	3028	3002	3113	2980	2978
10%	3333	3313	3281	3404	3249	3246
15%	3676	3656	3618	3742	3559	3560
20%	4048	4030	3985	4099	3903	3894
30%	4828	4780	4745	4876	4569	4592
40%	5550	5515	5458	5626	5242	5265
50%	6160	6145	6066	6245	5823	5894

Tabulka 20: Zpětný tlak během analýzy na koloně BEH HILIC

AmAc – octan amonný, AcAc – kyselina octová

Konc. vodné složky MP	voda	10mM AmAc 9,8	50 mM AmAc 3,8	50 mM AmAc 4,8	50 mM AmAc 5,8	50mM AmAc 6,8	50 mM AmAc 7,8	50mM AmAc 8,8	50mM AmAc 9,8	100mM AmAc 9,8	AcAc 0,5%	AcAc 0,1%
5%	3253	3479	3345	3332	3334	3340	3338	3332	3368	-	3331	3349
10%	3570	3715	3612	3602	3646	3609	3651	3719	3699	3803	3616	3634
15%	3952	4106	3972	3955	3974	3961	4037	4039	4095	4236	3979	3969
20%	4341	4542	4379	4369	4384	4670	4461	4463	4569	4689	4372	4358
30%	5168	5376	5197	5197	5189	5189	5238	5330	5316	5675	5193	5188
40%	5947	6196	6005	5998	5954	5978	6145	6146	6097	6567	5956	5966
50%	6656	6934	6678	6659	6662	6798	6678	6920	6920	7364	6667	6656

Tabulka 21: Zpětný tlak během analýzy na koloně BEH AMIDE (2. generace BEH sorbentu)

AmAc – octan amonný, AcAc – kyselina octová

Konc. vodné složky MP	voda	10 mM AmAc 9,8	50 mM AmAc 3,8	50 mM AmAc 4,8	50mM AmAc 5,8	50 mM AmAc 6,8	50mM AmAc 7,8	50mM AmAc 8,8	50mM AmAc 9,8	100mM AmAc 9,8	AcAc 0,5%	AcAc 0,1%
5%	3464	3422	3420	3419	3426	3422	3431	3403	3404	-	3410	3413
10%	3778	3727	3730	3834	3730	3744	3739	3727	3721	3742	3733	3736
15%	4155	4111	4132	4105	4120	4129	4119	4117	4117	4142	4104	4120
20%	4562	4542	4538	4524	4542	4549	4539	4537	4536	4538	4523	4539
30%	5422	5378	5499	5386	5414	5422	5412	5407	5395	5448	5353	5374
40%	6205	6199	6472	6191	6238	6245	6249	6218	6206	6677	6189	6186
50%	6900	6932	7407	6909	6956	6942	6966	6947	7112	7482	6873	6986

Tabulka 22: Zpětný tlak během analýzy na koloně BEH GLYCAN (1. generace BEH sorbentu)

AmAc – octan amonný, AcAc – kyselina octová

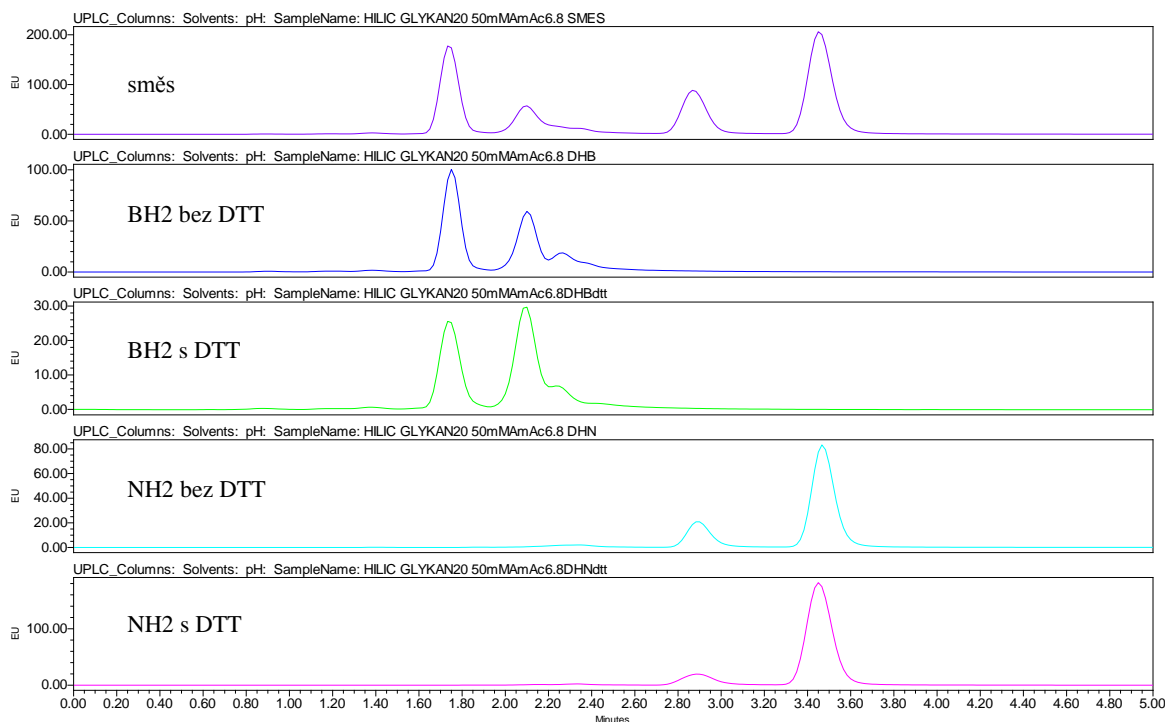
5.2 ZVÝŠENÍ STABILITY REDUKOVANÝCH FOREM PTERIDINŮ

Vzhledem k nedostatečné stabilitě redukováných forem pteridinů byl hledán způsob, jak tento nedostatek odstranit. Kvůli fotosenzitivně a snadné oxidaci redukováných forem pteridinů díky působení vzdušného kyslíku byly hledány podmínky, jak správně zacházet se vzorky těchto látek. Základním předpokladem bylo ukládat je v temnu, v dobře uzavřených tmavých vialkách a při snížené teplotě (v lednici). Pouze tato opatření ale nebyla dostatečná. Po nástřiku samotného NH₂ se tvořily místo jednoho píku (HN₂) píky dva (NEO a NH₂). BH₂ dokonce někdy tvořil píky tři (BIO, BH₂ a pravděpodobně BH₄). V mnoha studiích byly za účelem zvýšení stability redukováných forem použity antioxidační látky (např. kyselina askorbová, dithiothreitol). Na základě těchto poznatků byl vyzkoušen vliv kyseliny askorbové a dithiothreitolu na stabilitu redukováných forem.

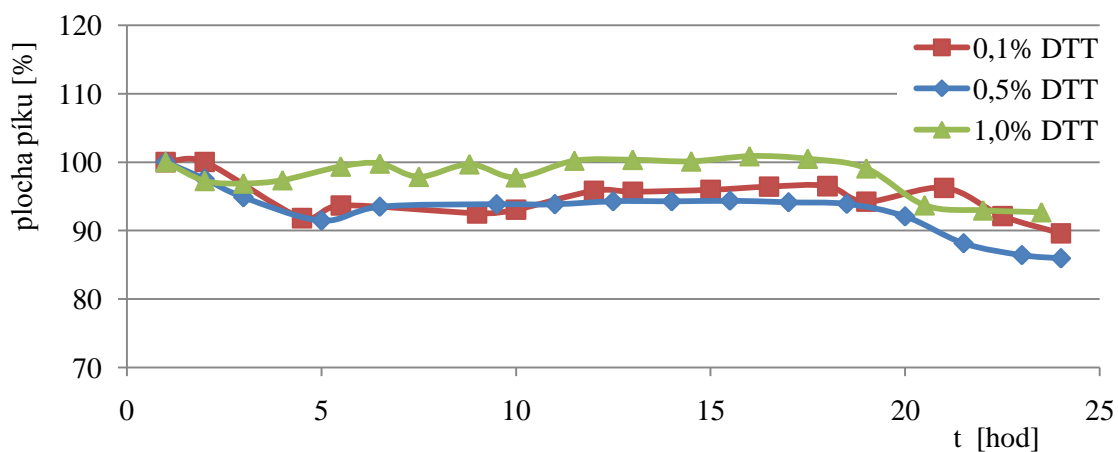
5.2.1 Zvýšení stability působením dithiothreitolu (DTT)

Jako první byl testován vliv přidaného DTT. Za účelem najít nejlepší podmínky, bylo zkoušeno několik koncentrací těchto roztoků (0,1%, 0,5% a 1,0%). V příslušné koncentraci roztoku DTT byl rozpouštěný standard zkoumané látky. Dále byl použit jako vodná složka zásobního roztoku, která se smísila s ACN v poměru 50:50.

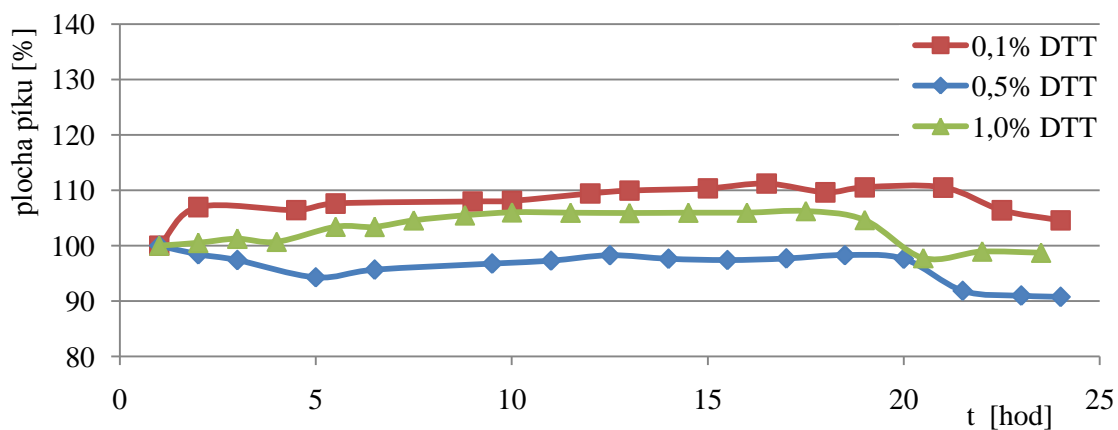
Testována byla směs všech čtyř pteridinů v průběhu 24 hodin za použití 0,1%, 0,5% a 1,0% DTT. Pokud byla v zásobním roztoku použita pouze voda, redukováná forma byla postupem času oxidována na BIO u BH₂ a na NEO u NH₂. Přidáním DTT do zásobního roztoku sice nebylo zabráněno úplné oxidaci redukováných forem, ale byla výrazně zvětšena jejich plocha a zároveň zmenšena plocha píku vznikajícího BIO a NEO (obrázek 24). Výsledky krátkodobé stabilitní studie byly znázorněny pomocí grafů. Plochy píků byly znázorněny procentuálně. V nulté a první hodině byla plocha píku rovna 100%, protože během první hodiny ještě nedocházelo k výrazné oxidaci redukováných forem pteridinů. Přidání DTT nepomohlo úplně zastavit oxidační proces, ale částečně ho zpomalit. Jak je vidět z následujících grafů (obrázek 25 – 30), po přidání DTT se plocha BIO a NEO lišila o $\pm 10\%$. Plocha BH₂ a NH₂ byla postupem času zmenšována přibližně o 20% (ale mnohem pomaleji než bez přidání DTT) a plocha BIO a NEO vzniklých z derivátů (BH₂ a NH₂) se měnila o $\pm 20\%$. Pík BIO a NEO se z nástřiku redukováných forem nepodařilo odstranit. Byly by třeba další studie, které by dokázaly, zda jejich stopy nejsou přítomny již v substanci.



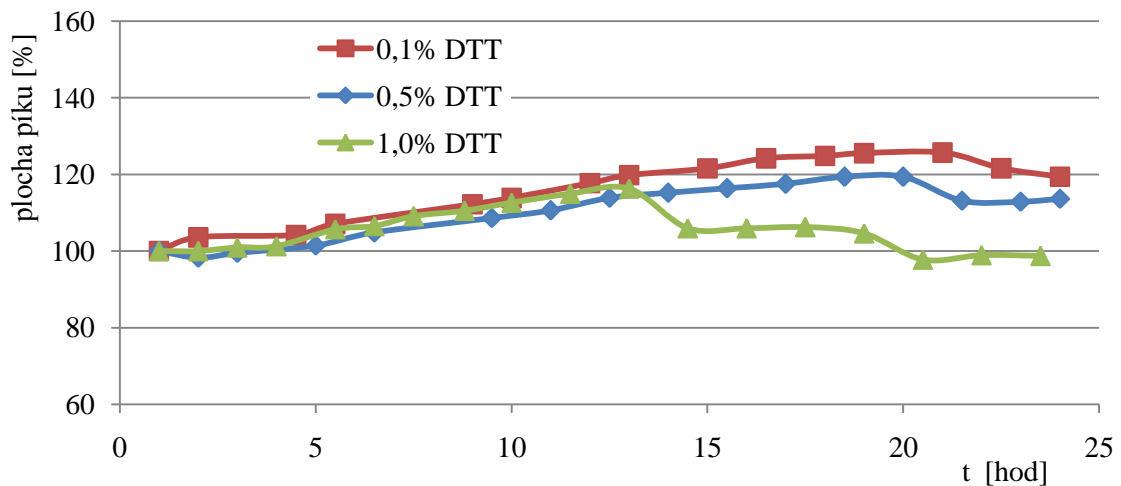
Obrázek 24: Porovnání píků redukovaných forem pteridinů s přidáním a bez přidání DTT



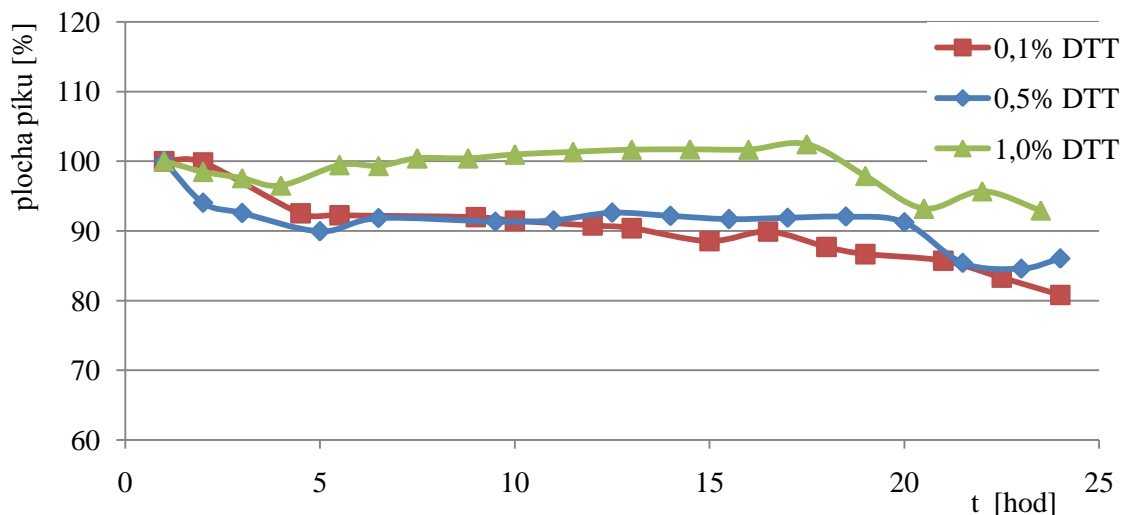
Obrázek 25: Vývoj plochy píku BIO v průběhu 24 hodin s použitím 0,1%, 0,5% a 1,0% DTT



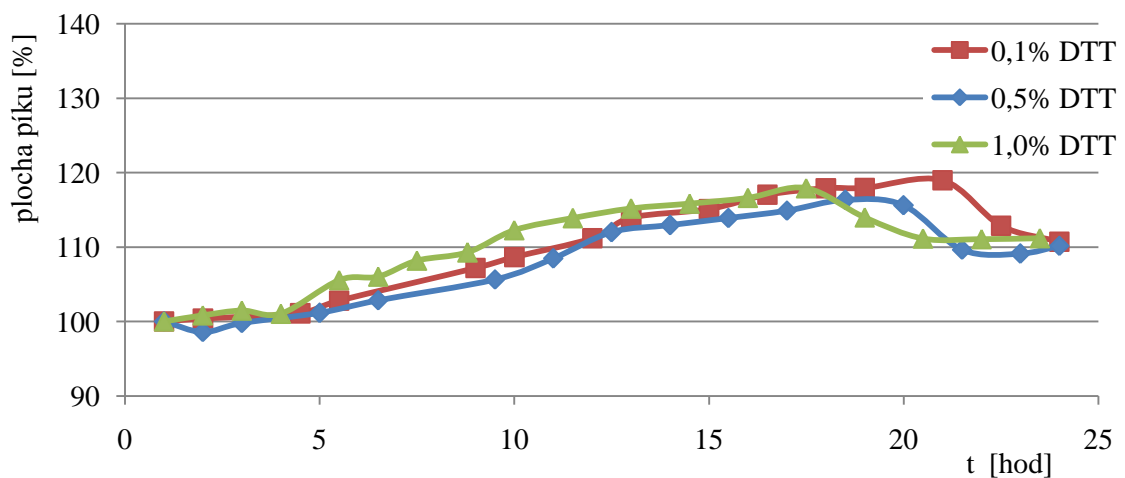
Obrázek 26: Vývoj plochy píku NEO v průběhu 24 hodin s použitím 0,1%, 0,5% a 1,0% DTT



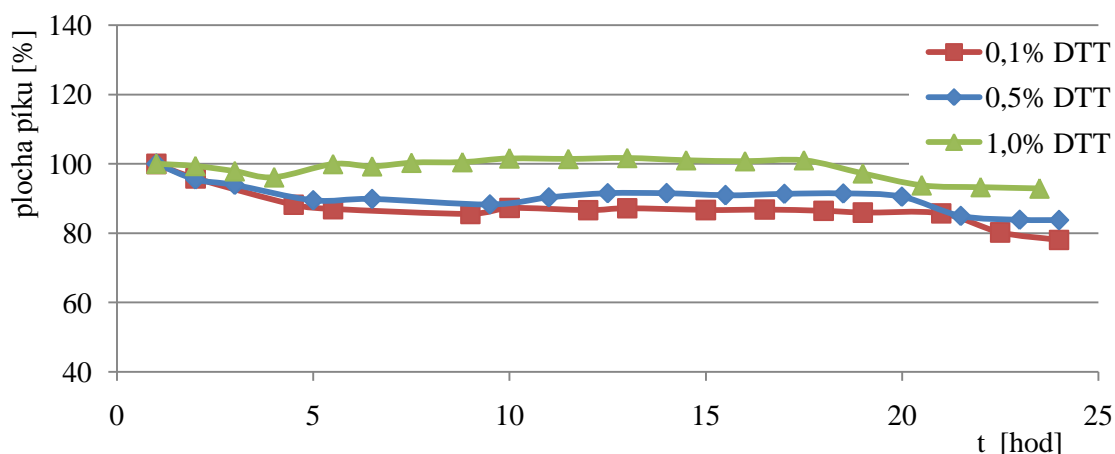
Obrázek 27: Vývoj plochy píku BIO vzniklého při nástřiku BH2 v průběhu 24 hodin s použitím 0,1%, 0,5% a 1,0% DTT



Obrázek 28: Vývoj plochy píku BH2 v průběhu 24 hodin s použitím 0,1%, 0,5% a 1,0% DTT



Obrázek 29: Vývoj plochy píku NEO vzniklého při nástřiku NH2 v průběhu 24 hodin s použitím 0,1%, 0,5% a 1,0% DTT

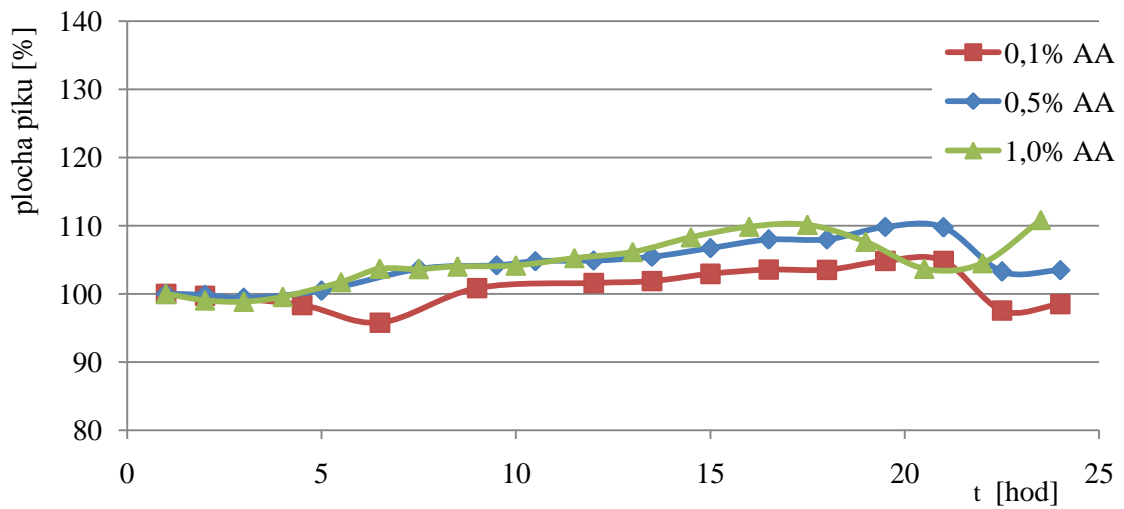


Obrázek 30: Vývoj plochy píku NH₂ v průběhu 24 hodin s použitím 0,1%, 0,5% a 1,0% DTT

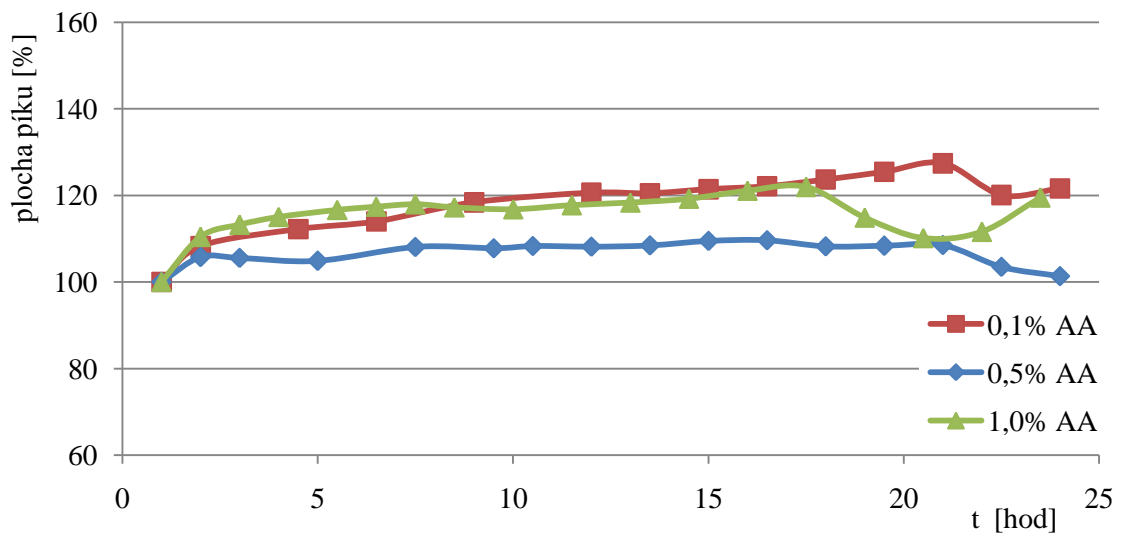
5.2.2 Zvýšení stability působením kyseliny askorbové (AA)

Dále byl testován vliv kyseliny askorbové na stabilitu redukovaných forem pteridinů. Byly zkoušeny tři koncentrace této látky (0,1%, 0,5% a 1,0%). Stejně jako v předešlém případě byl v tomto roztoku rozpouštěný standard zkoumané látky. Dále byl použit jako vodná složka zásobního roztoku, která byla mísená s ACN v poměru 50:50.

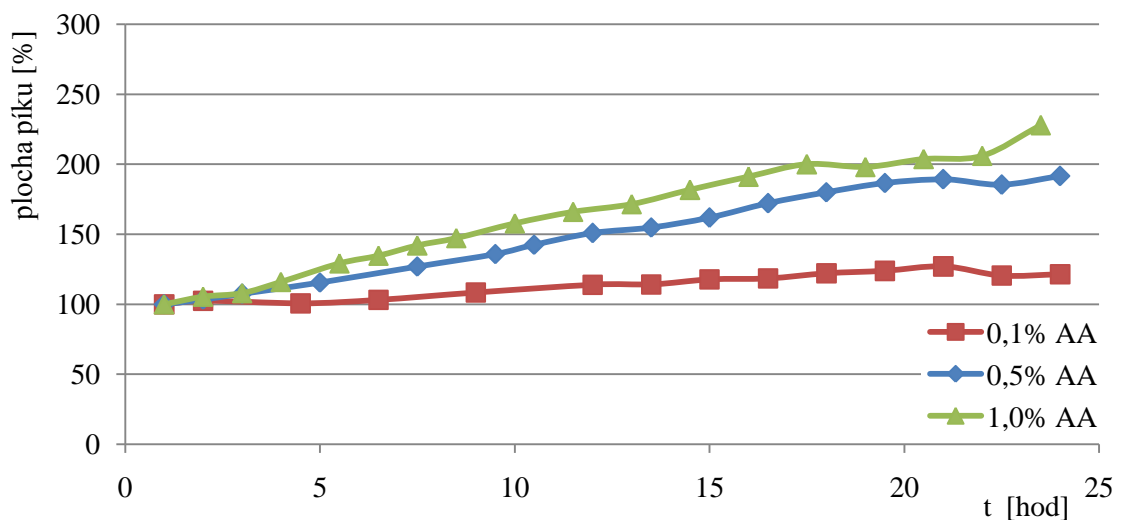
Směs zkoumaných pteridinů byla měřena v průběhu 24 hodin. Stejně jako u DTT nebylo dosaženo úplného zastavení oxidace, ale pouze zpomalen její průběh. Výsledky byly znázorněny pomocí grafů. Plochy píků BIO se měnily o $\pm 10\%$, u NEO o $\pm 20\%$. U redukovaných forem BH₂ a NH₂ byly plochy píků poměrně stabilní, byly zmenšovány pouze o 10%. Razantní změna byla zaznamenána u BIO a NEO získaných oxidací derivátů. Plocha píku BIO získaného z BH₂ vzrostla dvojnásobně a plocha NEO získaného z NH₂ vzrostla až osminásobně (obrázek 31 - 36). Tyto změny se nám nepodařilo vysvětlit a vyžadují další podrobnou studii, která je nyní prováděna v rámci navazujícího projektu GA-UK.



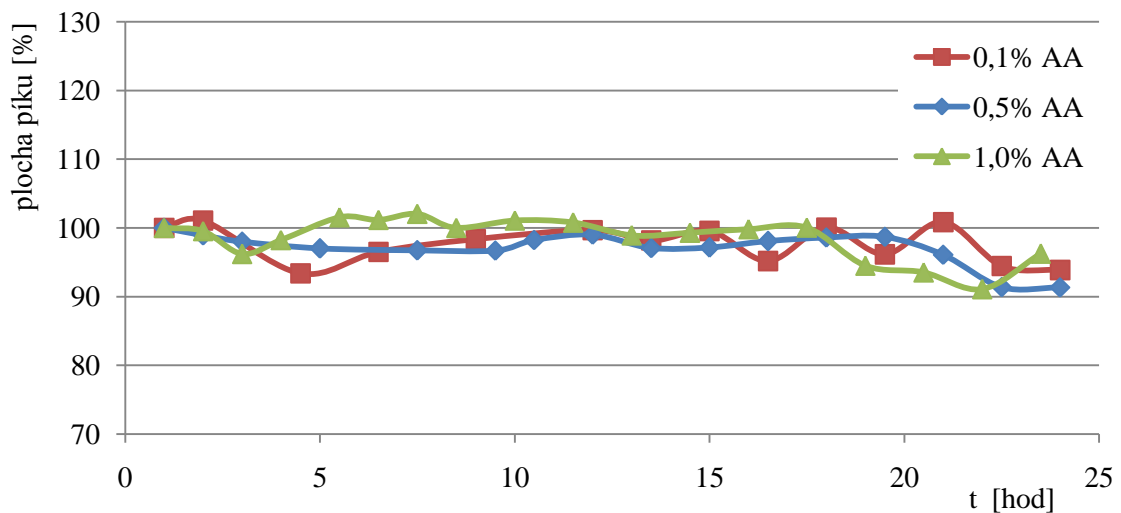
Obrázek 31: Vývoj plochy píku BIO v průběhu 35 hodin s použitím 0,1%, 0,5% a 1,0% AA



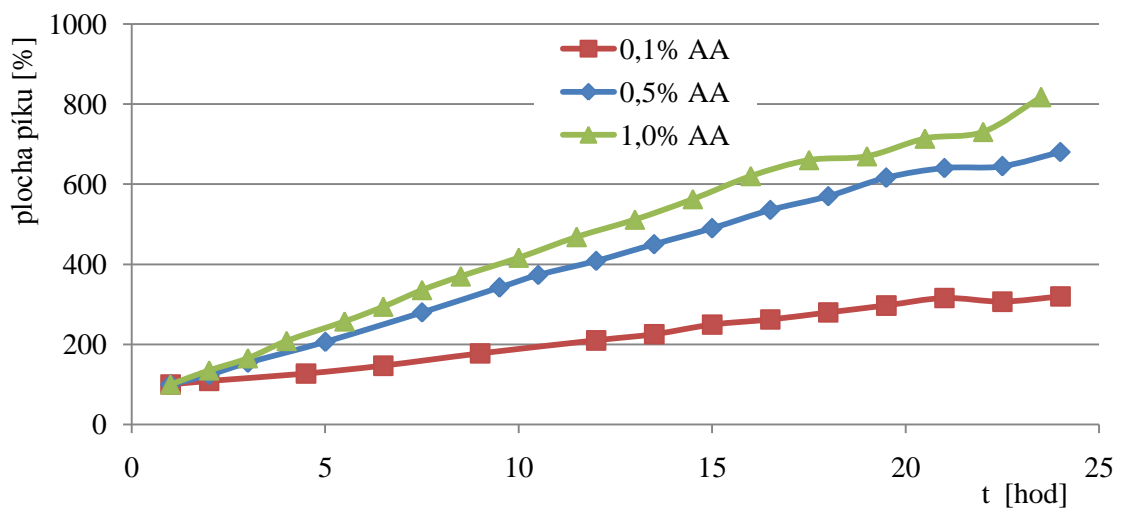
Obrázek 32: Vývoj plochy píku NEO v průběhu 35 hodin s použitím 0,1%, 0,5% a 1,0% AA



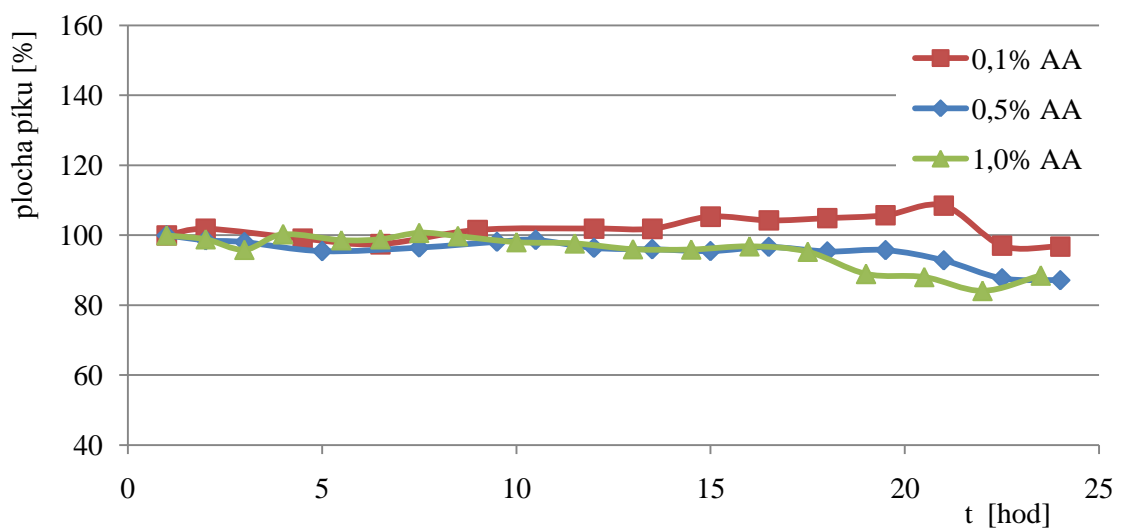
Obrázek 33: Vývoj plochy píku BIO vzniklého při nástřiku BH2 v průběhu 35 hodin s použitím 0,1%, 0,5% a 1,0% AA



Obrázek 34: Vývoj plochy píku BH2 v průběhu 35 hodin s použitím 0,1%, 0,5% a 1,0% AA



Obrázek 35: Vývoj plochy píku NEO vzniklého při nástřiku NH2 v průběhu 35 hodin s použitím 0,1%, 0,5% a 1,0% AA



Obrázek 36: Vývoj plochy píku NH2 v průběhu 35 hodin s použitím 0,1%, 0,5% a 1,0% AA

5.3 VALIDACE METODY HILIC

Testované parametry:

- **SST:** Účinnost chromatografické kolony
(počet teoretických pater a výškový ekvivalent teoretického patra)
Faktor symetrie píků
Rozlišení chromatografických píků
Opakovatelnost retenčního času a plochy píku
- **Validace:** Linearita a kalibrační rozmezí
Citlivost (LOD, LOQ)

Vzhledem k tomu, že na chromatografické koloně BEH HILIC od sebe nebyly jednotlivé píky odděleny až na základní linii, byly zmíněné parametry zkoumány pouze na dvou chromatografických kolonách (BEH AMIDE a BEH GLYCAN). Testování proběhlo za podmínek, které byly vyhodnoceny jako optimální pro analýzu směsi standardů. Důraz byl kladen na tvar píku, čas analýzy a zejména na to, aby za stanovených podmínek byly jednotlivé píky dostatečně separované.

Podmínky, které byly vyhodnoceny jako optimální, jsou uvedeny v tabulce 23.

Analytická kolona	BEH AMIDE (1,7 μ m, 2,1 \times 100mm)	BEH GLYCAN (1,7 μ m, 2,1 \times 100mm)
Mobilní fáze	50mM AmAc, pH=3,8 : ACN (20:80)	50mM AmAc, pH = 6,8 : ACN (20:80)
	50mM AmAc, pH=6,8 : ACN (15:85)	
	50mM AmAc, pH=9,8 : ACN (10:90)	
Průtoková rychlost	0,4 ml/min	0,4 ml/min
Dávkovací objem (μ l)	1 μ l	1 μ l
Teplota ($^{\circ}$ C)	30 $^{\circ}$ C	30 $^{\circ}$ C
Detekce (nm)	FD (353nm/438nm)	FD (353nm/438nm)

Tabulka 23: Podmínky použité pro testování SST parametrů

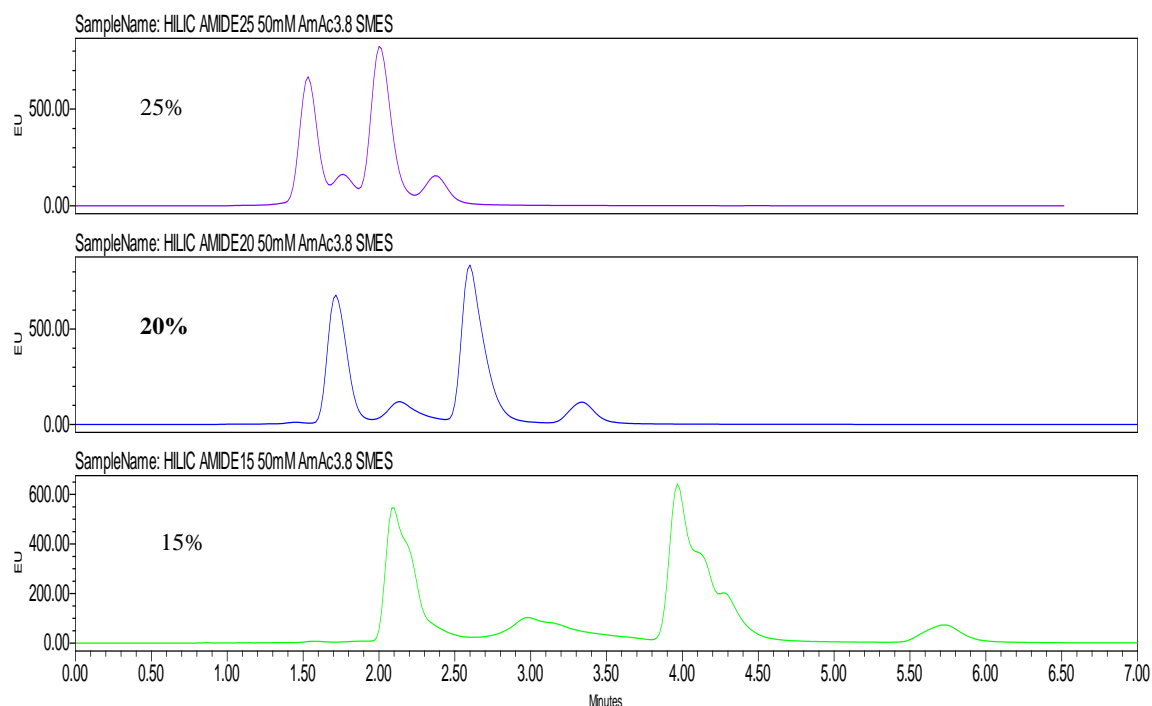
5.3.1 Chromatografická kolona BEH AMIDE

Na této koloně byl proveden test způsobilosti systému (SST) se směsí BIO, NEO, BH2 a NH2. Měření bylo provedeno desetkrát.

Napoprvé byl vzorek na kolonu nanášen v objemu 5 μ l. Po první analýze ale bylo toto množství vyhodnoceno jako nevhodné, vzhledem k širokým píkům BIO a NEO, což významně snižovalo účinnost. Dávkovací objem byl ve studii pana Hermtröma a Irguma [50] vyhodnocen jako klíčový pro HILIC metodu. Výsledky této studie byly naší analýzou potvrzeny. Proto byl pro další měření použit pouze 1 μ l vzorku, kdy byl tvar píků pteridinů více symetrický.

Byly zvoleny tři koncentrace 50mM AmAc při třech odlišných hodnotách pH. Výběr byl založen na chromatogramech zobrazených na obrázku 37, 38, 40.

A) 20% 50mM AmAc, pH = 3,8/ACN, f = 0,4 ml/min



Obrázek 37: Vyhodnocení nejlepších separačních podmínek pro směs pteridinů za použití 50mM AmAc pH 3,8 s obsahem vodné složky: 25%, 20%, 15%

Test způsobilosti systému

Látka	Účinnost (N)	Výškový ekvivalent (H)	Faktor symetrie (A_S)	Rozlišení (R_S)	RSD (A)	RSD (R_t)
BIO	1512	66	1,08	-	1,66	0,08
BH2	1958	51	0,99	2,24	0,28	0,07
NEO	1978	50	1,79	2,68	5,21	0,05
NH2	4124	24	1,11	3,00	1,05	0,05

Tabulka 24: Průměrné hodnoty testovaných parametrů SST pro 20% 50mM AmAc při pH 3,8

Požadavek na počet teoretických pater $N > 900$ byl splněn u všech látek.

Požadavek na faktor symetrie píku $A_S < 1,5$ byl splněn u všech látek kromě NEO.

Požadavek na rozlišení $R_S > 1,5$ byl splněn u všech testovaných látek.

Požadavek $RSD < 1\%$ pro opakovatelnost plochy píku byl splněn pouze u BH2, těsně nad požadovanou hranicí byl NH2.

Požadavek $RSD < 1\%$ pro opakovatelnost retenčního času byl splněn u všech testovaných látek.

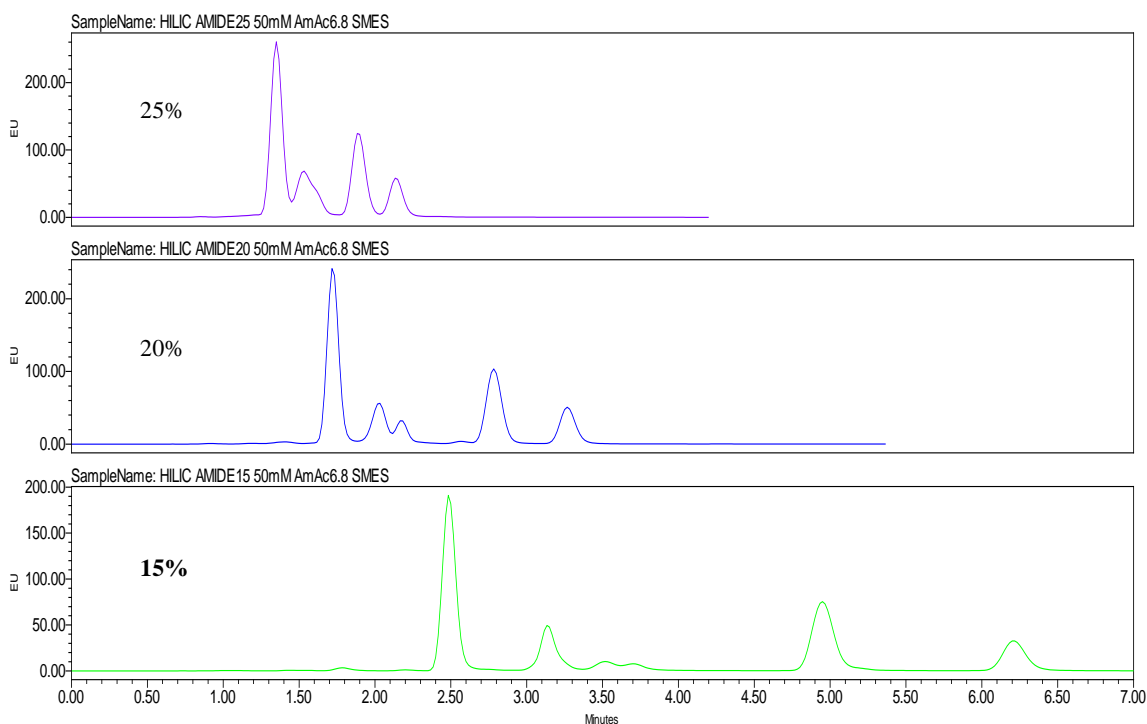
Linearita, rozmezí kalibrace a citlivost

Pro sestavení kalibračních křivek BIO, BH2, NEO, NH2 byly použity roztoky o koncentracích v rozmezí 0,2 – 2000 nmol/l. Měření bylo opakováno třikrát. Kalibrační křivky sestavené ze získaných hodnot byly pro všechny látky lineární. Korelační koeficient pro BIO, NEO a BH2 se pohyboval v rozmezí 0,9990 – 0,9997, zatímco u NH2 byl o něco nižší (0,9984). Podle očekávání byla metoda nejcitlivější pro BIO a NEO, a to díky jejich silné fluorescenci (viz. kapitola 3.1.2). Získané hodnoty byly zaznamenány do tabulky 25.

Látka	Rovnice přímky	Korelační koeficient	LOQ [nmol/l]	LOD [nmol/l]
BIO	$33794x + 451077$	0,9990	0,584	0,177
BH2	$1748,5x - 7179,4$	0,9997	1,650	0,500
NEO	$50860x + 49066$	0,9992	0,490	0,148
NH2	$280,4x - 8359,6$	0,9984	10,600	3,210

Tabulka 25: Ověření linearity a citlivost metody pro jednotlivé analyzované látky za použití 50mM AmAc 20% pH 3,8 na BEH AMIDE

B) 15% 50mM AmAc, pH = 6,8/ACN, f = 0,4 ml/min



Obrázek 38: Vyhodnocení nejlepších separačních podmínek pro směs pteridinů za použití 50mM AmAc pH 6,8 s obsahem vodné složky: 25%, 20% a 15%

Test způsobilosti systému

Látka	Účinnost (N)	Výškový ekvivalent (H)	Faktor symetrie (A_S)	Rozlišení (R_S)	RSD (A)	RSD (R_t)
BIO	8297	12	1,18	-	0,59	0,12
BH2	15 934	6	0,95	6,60	0,31	0,27
NEO	8674	11	1,09	11,78	1,14	0,13
NH2	13 474	7	1,07	5,80	1,00	0,26

Tabulka 26: Průměrné hodnoty testovaných parametrů SST pro 15% 50mM AmAc při pH 6,8

Požadavek na počet teoretických pater $N > 900$ byl splněn u všech látek.

Požadavek na faktor symetrie píku $A_S < 1,5$ byl splněn u všech látek.

Požadavek na rozlišení $R_S > 1,5$ byl splněn u všech testovaných látek.

Požadavek $RSD < 1\%$ pro opakovatelnost plochy píku nebyl splněn pouze u NEO.

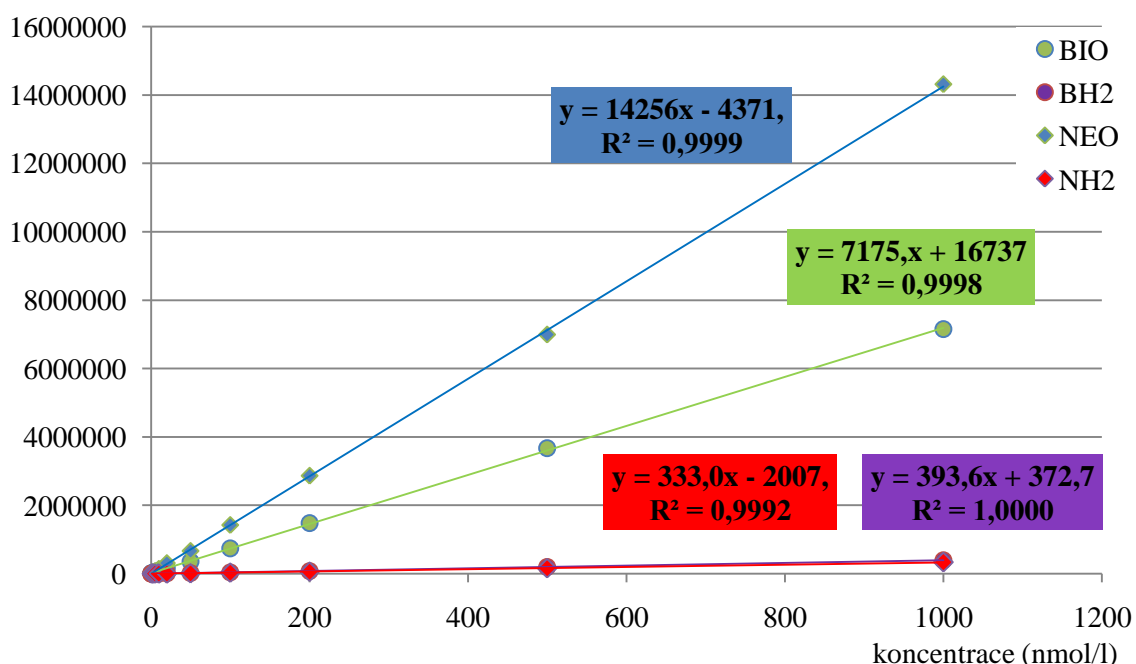
Požadavek $RSD < 1\%$ pro opakovatelnost retenčního času byl splněn u všech testovaných látek.

Linearita, rozmezí kalibrace a citlivost

Pro sestavení kalibračních křivek BIO, BH2, NEO, NH2 byly použity roztoky o koncentracích v rozmezí 0,2 – 2000 nmol/l. Měření bylo opakováno třikrát. Kalibrační křivky sestavené z naměřených hodnot byly pro všechny stanovované pteridiny lineární. Korelační koeficient se pohyboval v rozmezí 0,9992 – 0,9998, u BH2 byl dokonce roven jedné (obrázek 39). Metoda byla nejcitlivější pro NEO. Výsledky BIO a BH2 se hodnotě NEO velmi blížily (tabulka 27).

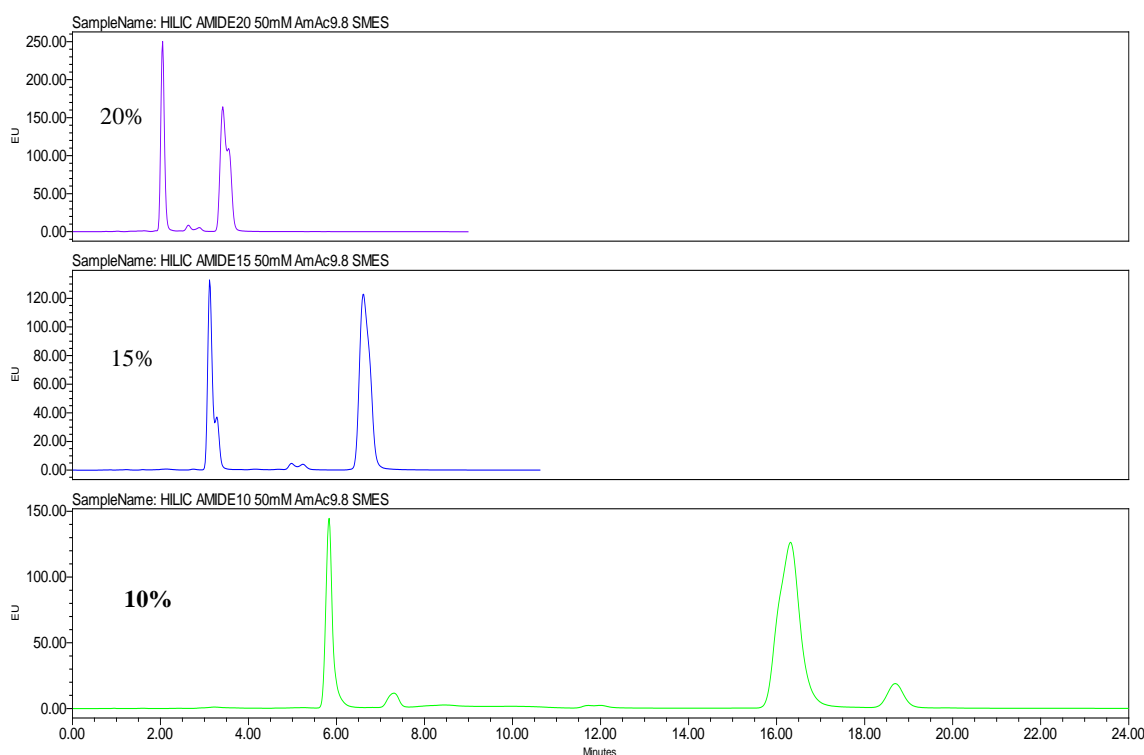
Látka	Rovnice přímky	Korelační koeficient	LOQ [nmol/l]	LOD [nmol/l]
BIO	$7175,2x + 16737$	0,9998	0,780	0,236
BH2	$393,66x + 372,77$	1,0000	0,844	0,256
NEO	$14256x - 4371,6$	0,9999	0,504	0,153
NH2	$333,04x - 2007,1$	0,9992	5,500	1,677

Tabulka 27: Ověření linearity a citlivost metody pro jednotlivé analyzované látky za použití 50mM AmAc 15% pH 6,8 na BEH AMIDE



Obrázek 39: Kalibrační křivky BIO, NEO, BH2 a NH2 - 15% 50mM AmAc pH 6,8

C) 10% 50mM AmAc, pH = 9,8/ACN, f = 0,4 ml/min



Obrázek 40: Vyhodnocení nejlepších separačních podmínek pro směs pteridinů za použití 50mM AmAc pH 9,8 s obsahem vodné složky: 20%, 15% a 10%

Test způsobilosti systému

Látka	Účinnost (N)	Výškový ekvivalent (H)	Faktor symetrie (A_S)	Rozlišení (R_S)	RSD (A)	RSD (R_t)
BIO	28 786	3	1,29	-	1,40	0,09
BH2	10 519	9	0,99	7,31	0,99	0,02
NEO	9017	11	1,14	18,76	1,85	0,02
NH2	16 931	6	1,14	4,45	0,79	0,02

Tabulka 28: Průměrné hodnoty testovaných parametrů SST pro 10% 50mM AmAc při pH 9,8

Požadavek na počet teoretických pater $N > 900$ byl splněn u všech látek.

Požadavek na faktor symetrie píku $A_S < 1,5$ byl splněn u všech látek.

Požadavek na rozlišení $R_S > 1,5$ byl splněn u všech testovaných látek.

Požadavek $RSD < 1\%$ pro opakovatelnost plochy píku byl splněn pouze u BH2 a NH2, BIO a NEO byly nad požadovanou hranicí.

Požadavek $RSD < 1\%$ pro opakovatelnost retenčního času byl splněn u všech testovaných látek.

Linearita, rozmezí kalibrace a citlivost

Pro sestavení kalibračních křivek BIO, BH2, NEO, NH2 byly použity roztoky o koncentracích v rozmezí 0,2 – 2000 nmol/l. Měření bylo opakováno třikrát. Kalibrační křivky byly pro všechny stanovované pteridiny lineární. Korelační koeficient byl v rozmezí 0,9990 – 0,9998. Metoda byla nejcitlivější pro BIO a NEO a nejméně citlivá pro NH2 (tabulka 29).

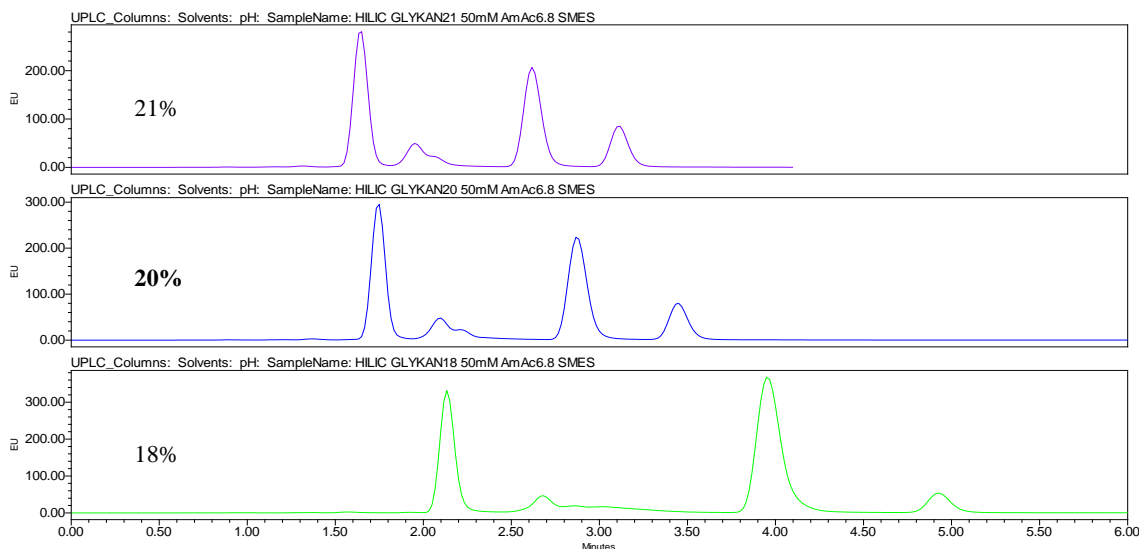
Látka	Rovnice přímky	Korelační koeficient	LOQ [nmol/l]	LOD [nmol/l]
BIO	$5586,1x - 5977,6$	0,9993	0,510	0,155
BH2	$180,5x - 588,84$	0,9998	5,820	1,760
NEO	$10321x + 21316$	0,9994	0,544	0,165
NH2	$313,7x - 3577$	0,9990	13,340	4,040

Tabulka 29: Ověření linearity a citlivost metody pro jednotlivé analyzované látky za použití 50mM AmAc 10% pH 9,8 na BEH AMIDE

5.3.2 Chromatografická kolona BEH GLYCAN

Pro tuto kolonu byla za optimální mobilní fázi vybrána 50 mM AmAc o pH 6,8 s 20% obsahem vodné složky a 80% ACN. Při menším množství vodné složky (než 20%) se sice jednotlivé píky od sebe více separovaly, ale u BH2 docházelo k nežádoucímu chvostování, které zkreslovalo výsledky (obrázek 41).

20% 50mM AmAc, pH = 6,8/ACN, f = 0,4 ml/min



Obrázek 41: Vyhodnocení nejlepších separačních podmínek pro směs pteridinů za použití 50mM AmAc pH = 6,8 s obsahem vodné složky: 21%, **20%** a 18%

Test způsobilosti systému

Pro tento test byl stejně jako u předcházející kolony použit roztok směsi všech standardů pteridinů. Měření bylo provedeno desetkrát.

Látka	Účinnost (N)	Výškový ekvivalent (H)	Faktor symetrie (A_S)	Rozlišení (R_S)	RSD (A)	RSD (R_t)
BIO	2150	46	1,04	-	0,69	0,15
BH2	1961	51	1,84	2,11	2,73	0,23
NEO	3446	29	1,12	4,00	2,87	0,14
NH2	4526	22	1,19	2,95	1,52	0,21

Tabulka 30: Průměrné hodnoty testovaných parametrů SST pro 20% 50mM AmAc při pH 6,8

Požadavek na počet teoretických pater $N > 900$ byl splněn u všech testovaných látek.

Požadavek na faktor symetrie píku $A_S < 1,5$ byl splněn u všech testovaných látek.

Požadavek na rozlišení $R_S > 1,5$ byl splněn u všech testovaných látek.

Požadavek $RSD < 1\%$ pro opakovatelnost plochy píku byl splněn pouze u BIO. RSD pro ostatní pteridiny bylo větší než 1%, a proto nespĺňovaly stanovené limity. Vliv na tento výsledek může mít malá separační účinnost kolony, tvar píku nebo stabilita. Požadavek $RSD < 1\%$ pro opakovatelnost retenčního času byl splněn u všech testovaných látek.

Linearita, rozmezí kalibrace a citlivost

Pro sestavení kalibračních křivek BIO, BH2, NEO a NH2 byly použity roztoky o koncentracích v rozmezí 0,2 – 2000 nmol/l (tabulka 31). Kalibrační křivky sestavené ze získaných hodnot byly pro všechny látky lineární. Korelační koeficient byl pro všechny pteridiny kromě NH2 roven 0,9990, u kterého byl nižší (0,9988). Metoda byla nejcitlivější pro BIO a NEO a nejméně citlivá pro BH2.

Látka	Rovnice přímky	Korelační koeficient	LOQ [nmol/l]	LOD [nmol/l]
BIO	$8715x + 8982,4$	0,9990	0,708	0,214
BH2	$405,02x - 1059,7$	0,9990	4,570	1,380
NEO	$8015,6x + 39216,8$	0,9990	0,576	0,174
NH2	$255,13x - 5943,4$	0,9988	2,950	0,894

Tabulka 31: Ověření linearity a citlivost metody pro jednotlivé analyzované látky za použití 50mM AmAc 20% pH 6,8 na BEH GLYKAN

6. ZÁVĚR

1. Byly testovány celkem tři analytické HILIC kolony (BEH AMIDE, BEH GLYCAN, BEH HILIC) za použití různých chromatografických podmínek. Všechny kolony byly založeny na hybridní stacionární fázi (BEH), která umožňovala pracovat v rozmezí pH od 1 – 8 (pro BEH HILIC) a 2 – 11 (pro BEH AMIDE a BEH GLYCAN). Délka kolony i velikost částic byly u všech tří typů kolon stejné ($2,1 \times 100$ mm, $1,7 \mu\text{m}$). Za HILIC podmínek bylo eluční pořadí pozorovaných analytů následující: BIO – BH2 – (BH4) – NEO – NH2.
2. V rámci testování bylo zkoumáno retenční chování jednotlivých pteridinů v závislosti na poměru organické a vodné složky mobilní fáze, vliv přidaných přísad do mobilní fáze, molaritě a na pH.

Největší vliv na retenci pteridinů měla změna poměru vodné a organické složky mobilní fáze. Se zvyšující se koncentrací organické složky mobilní fáze zároveň rostla retence. Od 50% - 85% koncentrace ACN v MP rostla retence pozvolna, naproti tomu při 95% koncentraci ACN byl nárůst mnohem výraznější. Došlo k extrémní retenci, která ale už nebyla pro běžné a rychlé stanovení pteridinů žádoucí. Doba analýzy se pro NEO pohybovala i v řádech hodin.

Do vodné složky mobilní fáze byl přidáván octan amonný (10mM – 100mM) nebo kyselina octová (0,1% a 0,5%). Vliv pH byl testován v rozmezí 3,8 – 9,8.

Nejsilnější retence bylo dosaženo při použití 100mM octanu amonného při pH 9,8. U 50mM octanu amonného v rozmezí pH 4,8 – 8,8 byla schopnost retence podobná. Nejnižší retence bylo dosaženo použitím octanu amonného při pH 3,8 a při použití zředěné kyseliny octové.
3. Kolona BEH HILIC nebyla pro analýzu směsi pteridinů použita, protože neposkytovala dostatečnou selektivitu ani retenci. Přestože bylo separace samotného BIO a NEO docíleno za všech zkoumaných podmínek, nedocházelo u ní k vyhovující separaci směsi pteridinů. Zejména páry BIO – BH2 a NEO – NH2 se od sebe vůbec nepodařilo oddělit. Proto byla pro tuto studii označena jako nevhodná.
4. Naproti tomu kolony BEH AMIDE a BEH GLYKAN umožnily dobrou separaci všech čtyř pteridinů. pH nižší než 4,8 sice poskytovalo velmi široké píky, které neumožnily separaci derivátů, ale pH 4,8 – 7,8 bylo pro separaci vhodné. Za použití vysokého pH (9,8) již nedocházelo k lepší separaci derivátů. Navíc byla prodlužována doba analýzy, což nebylo žádoucí.

5. Klíčový problémem analýzy byla stabilita derivátů pteridinů (BH2 a NH2). Přestože bylo dodržováno uchovávání vzorků v temnu, chladu a bez přístupu kyslíku, redukované formy podléhaly oxidaci. Snaha zvýšit stabilitu přidáním dithiothreitolu či kyseliny askorbové přispěla k pomalejší oxidaci derivátů, ale zcela ji nezastavila.

Nejlepší výsledky poskytl 0,5% dithiothreitol, který zvětšil plochu píků redukovaných forem, zpomalil oxidaci a zmenšil plochu píků BIO a NEO, které vznikaly z redukovaných forem. Kyselina askorbová také zpomalila oxidaci derivátů pteridinů. Plochy píků derivátů se sice během 24 hodin zmenšili pouze o 10%, ale zároveň se výrazně zvětšila plocha píků BIO a NEO separovaných ze vzorků derivátů. U BIO vzrostla plocha píku dvakrát a u NEO dokonce osmkrát.

Otázka stability redukovaných forem pteridinů během této studie nebyla vyřešena.

6. Pro test způsobilosti systému a ověření linearity byly vybrány dvě chromatografické kolony (BEH AMIDE a BEH GLYCAN) a nalezeny optimální mobilní fáze pro separaci zkoumaných látek. Pro kolonu BEH AMIDE byly zvoleny tři druhy mobilní fáze, a to:

50mM AmAc při pH = 3,8, voda: ACN (20:80)

50mM AmAc při pH = 6,8, voda: ACN (15:95)

50mM AmAc při pH = 9,8, voda: ACN (10:90)

Pro chromatografickou kolonu BEH GLYCAN byl zvolen pouze jeden druh mobilní fáze, a to:

50mM AmAc při pH = 6,8, voda: ACN (20:80).

Test způsobilosti systému poskytl za všech testovaných podmínek uspokojivé výsledky. Porovnání výsledků separační účinnosti ukázalo, že je zvyšována v závislosti na rostoucím pH. Separační účinnost při pH 3,8 byla nižší než při pH 9,8, kdy bylo dosaženo nejlepších výsledků.

Porovnáním amidových kolon první a druhé generace při pH 6,8 bylo zjištěno, že kolona první generace (BEH GLYKAN) vykazuje nižší separační účinnost než kolona generace druhé (BEH AMIDE).

7. Po sestavení kalibračních křivek bylo zjištěno, že všechny vybrané metody jsou lineární. Nejlepších výsledků bylo dosaženo na koloně BEH AMIDE při pH 6,8, kde byla hodnota korelačního koeficientu v rozmezí 0,9992 – 1. Přestože se všechny hodnoty korelačních koeficientů blížily jedné, bylo patrné, že s rostoucím pH rostla i hodnota korelačních koeficientů. Hodnoty získané na koloně BEH GLYKAN byly nižší, než na koloně BEH AMIDE.

V rámci kvantitativního a detekčního limitu bylo zjištěno, že citlivost metody pro BIO a NEO byla na obou kolonách (BEH GLYKAN a BEH AMIDE) při stejném pH podobná. Naproti tomu hodnoty limitů redukovaných forem pteridinů (BH2, NH2) se výrazně lišily (tabulka 32). V rámci rostoucího pH na koloně BEH AMIDE nebylo pozorováno zvýšení citlivosti metody. Podle očekávání byla metoda (na obou kolonách i při různém pH) vždy pro BIO a NEO citlivější než pro redukované formy, a to díky jejich silné fluorescenci charakteristické pro oxidované formy pteridinů.

	BEH AMIDE pH 3,8			BEH AMIDE pH 6,8		
	LOQ [nmol/l]	LOD [nmol/l]	R ²	LOQ [nmol/l]	LOD [nmol/l]	R ²
BIO	0,584	0,177	0,9990	0,780	0,236	0,9998
NEO	0,490	0,148	0,9992	0,504	0,153	0,9999
BH2	1,650	0,500	0,9997	0,844	0,256	1,0000
NH2	10,600	3,210	0,9984	5,50	1,667	0,9992
	BEH AMIDE pH 9,8			BEH GLYKAN pH 6,8		
	LOQ [nmol/l]	LOD [nmol/l]	R ²	LOQ [nmol/l]	LOD [nmol/l]	R ²
BIO	0,510	0,155	0,9993	0,708	0,214	0,9990
NEO	0,544	0,165	0,9994	0,576	0,174	0,9990
BH2	5,820	1,760	0,9998	4,570	1,380	0,9990
NH2	13,300	4,040	0,9990	2,950	0,894	0,9988

Tabulka 32: Porovnání citlivosti metody a ověření linearity na zkoumaných kolonách

8. Pro tuto analýzu byla za nejvhodnější kolonu zvolena kolona BEH AMIDE, a to díky svým vlastnostem umožňujících dostatečnou retenci a selektivitu pro separaci směsi všech čtyř pteridinů.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Hopkins F. G.: *Nature* 40 (1889) 335.
- [2] Tomandl J.: *Chem. Listy* 92 (1998) 689.
- [3] Forrest H. et al.: *Annu. Rev. Microbiolol* 24 (1970) 91.
- [4] Werner E. R. et al.: *J. Chromatogr. B* 684 (1996) 51.
- [5] Hrciarikova D. et al.: *Nutrition* 25 (2009) 303.
- [6] Fiege B. et al.: *Molecular Genetics and Metabolism* 81 (2004) 45.
- [7] Ormazabal A. et al.: *J. Neurosci. Meth.* 142 (2005) 153.
- [8] Sucher R. et al.: *Cancer Letters* 287 (2010) 13.
- [9] White R. H.: *Biochemistry* 35 (1996) 3447.
- [10] Merás I. D., et al.: *Anal. Biochem.* 346 (2005) 201.
- [11] Espinosa-Mansilla A. et al.: *Talanta* 77 (2008) 844.
- [12] Flavall E. A. et al.: *J. Chromatogr. B*, 863 (2008) 167.
- [13] Shen R.: *Arch. Biochem. Biophys.* 310 (1994) 60.
- [14] Fukushima T. et al.: *Anal. Biochem.* 89 (1978) 71.
- [15] Koshimura K. et al: *Progress in Neurobiology* 61 (2000) 415.
- [16] Cañada-Cañada F. et al.: *Anal. Chim. Acta* 648 (2009) 113.
- [17] Messahel S. et al.: *Neurosci. Lett.* 241 (1998) 17.
- [18] Broquist H. et al.: *Proc. Soc. Biol. Med.* 89 (1955) 178.
- [19] Vásquez-Vivar J.: *Free Radical Biology & Medicine* 47 (2009) 1108.
- [20] Pérez B. et al.: *Molecular Genetics and Metabolism* 86 (2005) S11.
- [21] Rieder J. et al.: *Medical Hypotheses* (2003) 60(4) 531.
- [22] Turgan N., Habif S. et al.: *Clinical Biochemistry* 33 (2001) 271.
- [23] Wirleitner B. et al.: *Molecular Immunology* 42 (2005) 183.
- [24] Mori H. et al.: *Biochem. Mol. Biol. Int.* 40 (1996) 799.
- [25] Trehan S. et al.: *Clin. Biochem. Nutr.* 14 (1992) 195.
- [26] Nagatsu T. et al.: *Anal. Biochem.* 141 (1984) 472.
- [27] Mayersbach P. et al.: *Clin. Chem.* 40 (1994) 265.
- [28] Craine J. E. et al.: *Biol. Chem.* 247 (1972) 6082.
- [29] Guroff G.: *Methods Enzymol.* 18 (1971) 600.
- [30] Schroecksadel K., et al.: *J. Biochem. Biophys. Methods* 66 (2006) 99.
- [31] Dutov A. A. et al.: *Russian Journal of Physical Chemistry* 81 (2007) 421.
- [32] Svoboda P. et al.: *Anal. Biochem.* 383 (2008) 236.
- [33] Fekkes D., Voskuilen-Kooijman A.: *Clinical Biochemistry* 40 (2007) 411.
- [34] Vebreek M. M. et al.: *Molecular Genetics and matabolism* 95 (2008) 127.

- [35] Ribeiro de Castro M. et al.: *J. Biochem. Biophys. Methods* 59 (2004) 275.
- [36] Turgan N. et al.: *Clinical Biochemistry* 33 (2001) 271.
- [37] Kaneko Y. S. et al.: *Brain Research Protocols* 8 (2001) 25.
- [38] Klimeš J. a kol.: *Kontrola léčiv II.*, Karolinum, Praha 2007.
- [39] Mikeš O. a kol.: *Laboratorní chromatografické metody*, Nakladatelství technické literatury, Praha 1980.
- [40] Klouda P.: *Moderní analytické metody*, Pavel Klouda, Ostrava 2003.
- [41] Karlíček R. a kol.: *Analytická chemie pro farmaceuty*, Karolinum, Praha 2005.
- [42] <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10048919> - 1. 11. 2010.
- [43] Nguyen D. T. T., Veuthey J. L. et al.: *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1836.
- [44] Grunbach E.S. et al.: *Beginners guide to UPLC*, Waters Corporation, USA 2009.
- [45] Guillarme D., Veuthey J. L. et al.: *Guidelines for the use of UHPLC instruments*, LCAP, University of Geneva.
- [46] Nováková L., Vlčková H.: *Anal. Chim. Acta* 656 (2009) 8.
- [47] http://www.restek.com/Technical-Resources/Technical-Library/Pharmaceutical/pharm_A016 - 1. 4. 2011
- [48] <http://www.hplc.cz/UPLC/index.htm> - 1. 4. 2011
- [49] společnost Waters: *Advances in UPLC column technology*, Německo 2009
- [50] Hermström P., Irgum K.: *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1784.
- [51] Dejaegher B., Heyden Y. V.: *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 698.
- [52] <http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc5.pdf> - 27. 3. 2011
- [53] Grumbach E. S. et al.: *J. Sep. Sci.*, 31 (2008) 1511.
- [54] Fountain K. J. et al.: *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 740.
- [55] Jian W. et al.: *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 681.
- [56] Nguyen H. P. et al.: *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 793.
- [57] Chauve B. et al.: *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 752.
- [58] Alpert A. J.: *J. Chromatogr.* 499 (1990) 177.
- [59] Ikegami T. et al.: *J. Chromatogr. A*, 1184 (2008) 474.
- [60] McCalley D. V.: *J. Chromatogr. A*, 1171 (2007) 46.
- [61] Yoshida T.: *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 60 (2004) 265.
- [62] Jin G. Et al.: *Talanta* 76 (2008) 522.
- [63] Berthod A. et al.: *Talanta* 47 (1998) 1001.
- [64] Appelblad P., Jeasson T., et al.: *A Practical Guide to HILIC*, Umea, Sweden, Merck SeQuant AB, 2005.

- [65] Jandera P., Hájek T., Škeříková V., Soukup J.: *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 841.
- [66] Pesek J. J., Matyska M. T.: *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 637.
- [67] Alpert A. J. et al.: *J. Chromatogr. A*, 676 (1994) 191.
- [68] Churms S. A.: *J. Chromatogr. A*, 720 (1996) 75.
- [69] Montero C. M. Dodero M. C. R. et al.: *Chromatographia* 59 (2004) 15.
- [70] Molnár-Perl I.: *J. Chromatogr. A*, 891 (2000) 1.
- [71] Beutler J. A.: *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 20 (1997) 2415.
- [72] Beutler J. A., Kashman Y. et al.: *Bioorg. Med. Chem.*, 5 (1997) 1509.
- [73] Wuhrer M., Deelder A. M. et al.: *J. Chromatogr. B*, 825 (2005) 124.
- [74] Wuhrer M., Koeleman C. A. M. et al.: *J. Mass Spectrom.*, 232 (2004) 51.
- [75] Wada Y., Tariji M., Yoshida S.: *Anal. Chem.*, 76 (2004) 6560.
- [76] Yoshida T.: *Anal. Chem.*, 69 (1997) 3038.
- [77] Jiang W. et al.: *J. Chromatogr. A*, 1127 (2006) 82.
- [78] Tanaka H. et al.: *J. Chromatogr. A*, 987 (2003) 119.
- [79] Guo Y. et al.: *J. Chromatogr. A*, 1074 (2005) 71.
- [80] Hyun M. H., Whangbo S. H. et al.: *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 1615.
- [81] Lindner H. et al.: *J. Chromatogr. A*, 743 (1996) 137.
- [82] Kind T. et al.: *Analytical Biochemistry*, 363 (2007) 185.
- [83] Sarg B., Helliger W. et al.: *J. Biol. Chem.*, 279 (2004) 53458.
- [84] Oertel R., Renner U. et al.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (2004) 633.
- [85] Oertel R., Neumeister V., Kirch W.: *J. Chromatogr. A*, 1058 (2004) 197.
- [86] Giroud C., Michaud K. et al.: *J. Anal. Toxicol.* 28 (2004) 464.
- [87] Mitchell R. E., The K. L.: *Org. Biomol. Chem.* 3 (2005) 3540.
- [88] Dell'Aversano C., Hess P. et al.: *J. Chromatogr. A*, 1081 (2005) 190.
- [89] Ciminiello P., Dell'Aversano C. et al.: *Toxicon* 47 (2006) 174.
- [90] Svec F., Petro M. et al.: *Coll. Czech. Chem. Commun* 66 (2001) 1047.
- [91] Yanagida A. et al.: *J. Chromatogr. A*, 1143 (2007) 153.
- [92] Aversano C. D. et al.: *J. Chromatogr. A*, 1081 (2005) 190.
- [93] Dunn W. B., Bailey N. J. C. et al.: *Analyst* 130 (2005) 606.
- [94] Lafaye A., Junot C. et al.: *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 24723.
- [95] Český lékopis 2009, GRADA Publishing a.s. (2009).

8. PŘÍLOHA

Nováková Lucie, Kaufmannová Iva, Jánská Radka: Evaluation of hybrid hydrophilic interaction chromatography stationary phases for ultra-HPLC in analysis of polar pteridines, *Journal of Separation Science* 33 (2010) 765 - 772.