

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: Kateřina Málková

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

Název diplomové práce: HPLC hodnocení L-tryptofanu a jeho metabolitů v biologickém materiálu

Tématem diplomové práce bylo vyvinutí optimalizovaných podmínek pro stanovení L-tryptofanu a jeho metabolitů (L-kynurenin, kyselina kynurenová, serotonin, kyselina 5-hydroxyindol-3-octová, melatonin) pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Separace probíhala na silikagelové koloně Kinetex EVO C18 (100A, 150 × 3 mm, 5 μm) s předkolonou OPTI-GUARD 1 mm C18 za použití spektrofotometrické a fluorimetrické detekce. Výchozí parametry detekce uvedené v metodě byly nastavené pro kynurenin (absorbance při 369 nm, 227 nm a fluorescenční detekce Ex: 369 Em: 475). Detekční a eluční parametry metody byly dále optimalizovány dle přidávaných analyzovaných látek na základě jejich individuálních UV a fluorescenčních spekter.

Byly zkoušeny různé mobilní fáze, různá pH tlumivých roztoků. Výsledná mobilní fáze se skládala ze dvou složek:

- mobilní fáze A: voda + octanový tlumivý roztok 0,1 M; pH 4,5; methanol v poměru 97:3
- mobilní fáze B: methanol.

Byla využita eluce gradientová. Průtoková rychlost mobilní fáze byla 0,5 ml/min. Teplota na koloně byla nastavená na 30 °C. Objem nástřiku činil 100 μl. Celková doba analýzy byla 30 min.

HPLC analýza byla validována dle FDA směrníc. Jako vnitřní standard byl použitý vanilin. Hodnocené validační parametry byly selektivita, stabilita, linearita, správnost, přesnost – opakovatelnost a robustnost. Všechny nalezené hodnoty byly v přijatelném rozsahu.

Klíčová slova: L-tryptofan, L-kynurenin, kyselina kynurenová, serotonin, kyselina 5-hydroxyindol-3-octová, melatonin, HPLC