

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



Vývoj HPLC metody pro hodnocení metabolitů tryptofanu

Diplomová práce

Barbora Pšenčíková

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

Hradec Králové, 2020

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

V Hradci Králové dne 5. 5. 2020

Barbora Pšenčíková

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli PharmDr. Petru Kastnerovi, Ph.D. za cenné rady, ochotu a trpělivost při vypracování mé diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala také ostatním pracovníkům Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy za jejich pomoc a vytváření přátelského pracovního prostředí.

Obsah

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	ANALYZOVANÉ LÁTKY	9
2.1.1	Tryptofan	9
2.1.2	Metabolity tryptofanu	12
2.1.3	Využití tryptofanu a jeho metabolitů jako potencionálních léčiv	13
2.1.4	Fyzikálně chemické vlastnosti tryptofanu a jeho metabolitů	14
2.2	VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE	15
2.2.1	Obecná charakteristika	15
2.2.2	Princip separace	15
2.2.3	Instrumentace v HPLC	15
2.2.4	Stacionární fáze	16
2.2.5	Základní separační módy	17
2.2.6	Kolony použité v experimentální části	19
2.2.7	Detektory	21
2.2.8	Vyhodnocování výsledků	24
2.2.9	Validace	25
3	CÍL PRÁCE	29
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
4.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	30
4.2	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A POMŮCKY	31
4.2.1	Chromatografické kolony	31
4.2.2	Přístroje	31
4.2.3	Laboratorní sklo a pomůcky	32
4.3	OBECNÉ POSTUPY	32
4.3.1	Příprava mobilní fáze	32
4.3.2	Příprava roztoků	33
4.3.3	Příprava roztoků pro validaci metody	33
4.4	OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÉ METODY	36
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	38

5.1	KOLONA KINETEX HILIC	38
5.2	KOLONA SUPELCO DISCOVERY HS F5	39
5.3	SUPELCO ASCENTIS EXPRESS F5	43
5.4	PARAMETRY VYVINUTÉ METODY	44
5.5	VALIDACE METODY	46
5.5.1	Selektivita	46
5.5.2	Citlivost	47
5.5.3	Linearita	48
5.5.4	Správnost a přesnost	53
5.5.5	Opakovatelnost	56
5.5.6	Stabilita	57
5.6	SHRNUTÍ VÝSLEDKŮ VALIDACE	60
5.7	HODNOCENÍ MELATONINU	61
6	ZÁVĚR	63
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	64
8	POUŽITÁ LITERATURA	67

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: Barbora Pšenčíková

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

Název diplomové práce: Vývoj HPLC metody pro hodnocení metabolitů tryptofanu

Esenciální aminokyselina tryptofan je prekurzorem mnoha biologicky aktivních látek. V posledních letech bylo zjištěno, že se metabolity tryptofanu účastní patogeneze mnoha onemocnění, včetně neurodegenerativních chorob, psychiatrických poruch, autoimunitních nemocí nebo rakoviny. Z toho důvodu jsou potřebné analytické metody, které jsou schopny současně detekovat tryptofan a jeho metabolity.

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout optimální HPLC metodu pro hodnocení tryptofanu a jeho metabolitů (kynureninu, kyseliny kynurenové, serotoninu a 5-hydroxyindol-3-octové kyseliny) a prozkoumat možnosti hodnocení kyseliny chinolinové a melatoninu.

Chromatografická separace byla provedena pomocí kolony Supelco Ascentis Express F5, velikost částic 2,7 μm , 15 cm \times 3 cm, za použití spektrofotometrické a fluorescenční detekce. Parametry detekce byly: pro kynurenin UV detekce 369 nm, 254 nm, fluorescenční detekce Ex/Em: 369/475; pro kyselinu kynurenovou UV detekce 244 nm; pro tryptofan UV detekce 300 nm, fluorescenční detekce Ex/Em: 280/334; pro serotonin UV detekce 280 nm, fluorescenční detekce Ex/Em: 280/334, pro kyselinu 5-hydroxyindol-3-octovou UV detekce 276 nm, fluorescenční detekce Ex/Em: 276/333.

Byly testovány různé typy mobilních fází. Konečná mobilní fáze se skládala z vody + acetátového pufru 0,1M pH 3,5/acetonitril v poměru 92/8. Separace byla provedena izokratickou elucí. Průtok byl stanoven na 0,5 ml/min a teplota kolony byla nastavena na 30 °C. Nastřikovaný objem byl 20 μl a celková analýza trvala 10 min. Metoda byla dále validována dle směrnic FDA a všechny validované parametry byly v přijatelném rozmezí.

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

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Barbora Pšenčíková

Supervisor: PharmDr. Petr Kastner, Ph.D.

Title of thesis: Development of HPLC method for evaluation of tryptophan metabolites

The essential amino acid tryptophan is a precursor of several important bioactive compounds. In recent years it was found out that tryptophan metabolites are involved in the pathogenesis of many diseases, including neurodegenerative and psychiatric disorders, autoimmune diseases, or cancer. Therefore, the analytical methods for simultaneous determination of tryptophan and its metabolites are highly required.

The purpose of this diploma thesis was to develop an optimal HPLC method for determination of tryptophan and its metabolites (kynurenine, kynurenic acid, serotonin and 5-hydroxyindole-3-acetic acid) and to consider all the possible options of determination of quinolinic acid and melatonin.

The chromatographic separation was carried out by Supelco Ascentis Express F5 column, 2.7 μm particle size, 15 cm \times 3 mm, using spectrophotometric and fluorescence detection. Parameters of detection were for kynurenine UV detection 369 nm, 254 nm, fluorescence detection Ex/Em: 369/475; for kynurenic acid UV detection 244 nm; for tryptophan UV detection 300 nm, fluorescence detection Ex/Em: 280/334; for serotonin UV detection 280 nm, fluorescence detection Ex/Em: 280/334, for 5-hydroxyindole-3-acetic acid UV detection 276 nm, fluorescence detection Ex/Em: 276/333.

Various types of mobile phases were examined. The final mobile phase consisted of water + acetate buffer 0.1M pH 3.5/acetonitrile in a ratio 92/8. The separation was performed by isocratic elution. The flow rate was determined at 0.5 ml/min and the column temperature was set to 30 $^{\circ}\text{C}$. The injection volume was 20 μl and total routine took 10 min. Furthermore, the method was validated according to FDA guidelines and all the validated parameters were within acceptable ranges.

Key words: tryptophan, kynurenine, kynurenic acid, serotonin, 5-hydroxyindole-3-acetic acid, quinolinic acid, melatonin, HPLC

1 ÚVOD

Tato diplomová práce se zabývá vývojem HPLC metody pro hodnocení metabolitů tryptofanu při různých chromatografických podmínkách.

Tryptofan je jednou z dvaceti základních aminokyselin, které jsou přítomny v lidském organismu a slouží jako hlavní stavební složka pro syntézu bílkovin. Tryptofan je předmětem mnoha vědeckých zkoumání zejména kvůli celé řadě biologicky aktivních látek, na které je přeměňován. Kromě již dříve dobře známého serotoninu a melatoninu, je v současnosti pozornost zaměřena především na metabolity pocházející z kynurenové dráhy, která je blíže popsána v teoretické části.

Tryptofan a jeho metabolity se uplatňují zejména v patogenezi onemocnění centrálního nervového systému včetně neurodegenerativních a psychiatrických poruch. Významnou úlohu hrají také ve výzkumu rakoviny a autoimunitních chorob. Vzhledem k podstatné roli tryptofanu a jeho metabolitů v mnoha patologických procesech a jejich studiích, je nezbytná potřeba stanovení hladin těchto látek v krvi.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie patří v současnosti mezi nejčastěji používané separační metody nejen v oblasti analýzy léčiv, ale také v potravinářském průmyslu nebo kontrole kvality životního prostředí. V teoretické části jsou popsány její další výhody a uvedena její specifikace.

Experimentální část práce se zaměřuje na optimalizaci chromatografických podmínek za použití kombinace spektrofotometrické a fluorescenční detekce. Při vývoji metody bylo testováno několik typů chromatografických kolon s různým typem sorbentu a celá řada mobilních fází. Vyvinutá metoda byla validována dle oficiálních směrnic a umožňuje analýzu tryptofanu a jeho metabolitů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

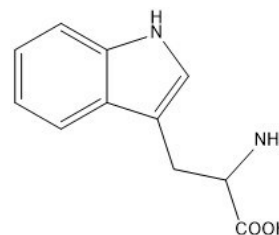
2.1 Analyzované látky

2.1.1 Tryptofan

Systematický název: kyselina (S)-2-amino-3-(1H-indol-3-yl)propanová ¹

Sumární vzorec: C₁₁H₁₂N₂O₂ ¹

Tryptofan patří mezi esenciální aminokyseliny, které nemohou být syntetizovány v lidském těle, a proto musí být přijímány potravou. Je nezbytný pro syntézu proteinů (méně než 1 %) a celé řady bioaktivních látek, jako jsou kynurenin, serotonin, melatonin nebo nikotinamidadeninukleotid (NAD⁺). ^{2, 3}



Obr. 1 Struktura tryptofanu

Doporučená denní dávka tryptofanu v potravě se pohybuje v rozmezí 250 – 425 mg/den, což je asi 3,5 – 6 mg/kg/den. U dětí a novorozenců by měl být příjem tryptofanu vyšší, asi 12 mg/kg/den. Významnými zdroji tryptofanu jsou: vejce, mléko, maso (zejména krůtí a kuřecí), sójové boby, ovesné vločky, brambory a ořechy. ^{4, 5}

Jedná se o bílý nebo téměř bílý krystalický nebo amorfní prášek, který je mírně rozpustný ve vodě a těžce rozpustný v 96% ethanolu. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů a minerálních kyselin. ¹

Tryptofan a jeho metabolity hrají důležitou úlohu v celé řadě onemocnění včetně neurodegenerativních onemocnění (Alzheimerova, Parkinsonova a Huntingtonova choroba), autoimunitních onemocnění (roztroušená skleróza, revmatoidní artritida) a kardiovaskulárních onemocnění. Dříve byl nedostatek tryptofanu a niacinu spojován zejména s pelagrou. Niacin (vitamin B₃) se tvoří z tryptofanu, ale významnějším zdrojem pro organismus je potrava. ^{2, 6, 7}

V současnosti roste význam tryptofanu především v oblasti výzkumu duševních poruch, zejména schizofrenie a deprese. Přibývají navíc důkazy, které poukazují na roli tryptofanu v patogenezi nádoru mozku a dalších typů rakoviny, jako je kolorektální karcinom, rakovina prsu a močového měchýře. ^{2, 6, 8}

2.1.1.1 Metabolismus tryptofanu

Tryptofan je metabolizován dvěma hlavními dráhami, kynurenovou a methoxyindolovou. Methoxyindolovou cestou je katabolizováno pouze asi 5 %

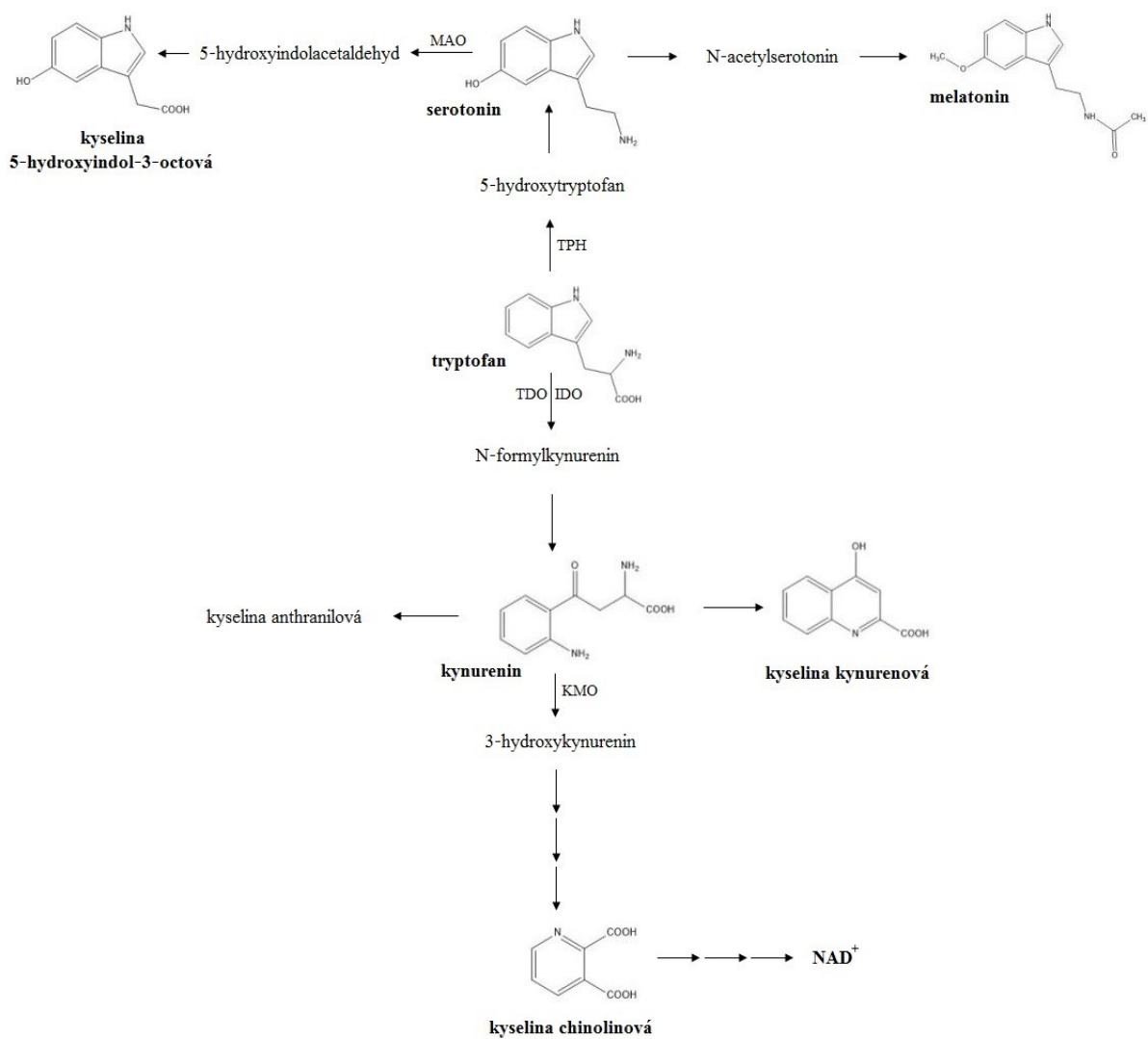
potravinou přijatého tryptofanu za vzniku serotoninu a melatoninu, dalších 95 % je potom odbouráváno pomocí dráhy kynurenové.⁶

Hydroxylací tryptofanu vzniká 5-hydroxytryptofan, který je dekarboxylován na serotonin. Syntéza serotoninu probíhá v neuronech (především v oblasti hypotalamu, mozkového kmene a epifýzy), v některých buňkách trávicího traktu a v krevních destičkách. V epifýze vzniká ze serotoninu melatonin. Serotonin je degradován monoaminoxidázou na 5-hydroxyindol-3-octovou kyselinu, která se vylučuje močí.^{7,9}

Kvantitativně významnější je přeměna tryptofanu na N-formylkynurenin pomocí indolamin 2,3-dioxygenasy (IDO) a tryptofan 2,3-dioxygenasy (TDO). Zatímco IDO je přítomna ve všech buňkách (nejvíce v placentě, plicích a ve střevech), TDO je exprimována hlavně v játrech. N-formylkynurenin je dále metabolizován na kynurenin, který může být katabolizován za vzniku kyseliny anthranilové, 3-hydroxykynureninu nebo kynurenové kyseliny.^{6,8,9}

Další katalýza 3-hydroxykynureninu potom vede ke vzniku kyseliny chinolinové, která je prekurzorem NAD^+ , případně ke vzniku kyseliny pikolinové. Syntéza NAD^+ a nikotinamidadenin dinukleotid fosfátu (NADP^+) z tryptofanu představuje pouze zlomek jejich potřeby.^{6,7}

Kynurenová dráha poskytuje několik neuroaktivních látek, kterými jsou kyselina kynurenová, kyselina chinolinová, 3-hydroxykynurenin a 3-hydroxyanthranilová kyselina. Zatímco kyselina kynurenová je antagonistou *N*-metyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů a je známá jako neuroprotektivní agens, ostatní látky jsou neurotoxické.^{6,7}



Obr. 2 Zjednodušené schéma metabolismu tryptofanu, zachycené jsou stanovované látky ¹⁰

2.1.2 Metabolity tryptofanu

2.1.2.1 Kyselina chinolinová

Systematický název: pyridin-2,3-dikarboxylová kyselina ¹¹

Sumární vzorec: C₇H₅NO₄ ¹¹

Chinolinová kyselina je excitotoxická a působí jako agonista na NMDA receptorech. Kromě vlastní toxicity potencuje také excitotoxicitu glutamátu, narušuje integritu hematoencefalické bariéry a přispívá k produkci volných kyslíkových radikálů. ⁸

Ve zdravé tkáni je její koncentrace v mozku nízká ve srovnání s krví a tkáněmi. V případě zánětlivé imunitní reakce dochází k dramatickému nárůstu hladiny kyseliny chinolinové. Její zvýšená hladina hraje roli v patogenezi mnoha onemocnění, např. v případě Huntingtonovy choroby, Alzheimerovy choroby, roztroušené sklerózy nebo epilepsie. ^{6, 8}

2.1.2.2 Serotonin (5-hydroxytryptamin)

Systematický název: 3-(2-aminoethyl)-1H-indol-5-ol ¹²

Sumární vzorec: C₁₀H₁₂N₂O ¹²

Serotonin je biogenní amin, který je přítomný v mozku, ale také na periférii. Serotonin v mozku představuje pouze asi 5 % z celkového obsahu serotoninu v těle a slouží jako neurotransmitter. Reguluje mnoho biologických pochodů včetně chování, učení, apetitu a glukózové homeostázy. Zbývajících 95 % serotoninu je produkováno v periferních orgánech, především střevními buňkami. Periferní serotonin hraje klíčovou roli při regulaci homeostázy glukózy a lipidů. ¹³

2.1.2.3 Melatonin

Systematický název: N-[2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl]acetamide ¹⁴

Sumární vzorec: C₁₃H₁₆N₂O₂ ¹⁴

Melatonin je hormon produkováno především epifýzou, avšak syntetizován je i v jiných orgánech a buňkách (sítnice, buňky kostní dřeně, krevní destičky, gastrointestinální trakt). Jeho sekrece dosahuje vrcholu uprostřed noci a k ránu se postupně snižuje. Melatonin se podílí na regulaci cirkadiálních rytmů, podporuje imunitní systém, zabraňuje stárnutí, má protizánětlivé a antioxidační účinky. Kromě toho vykazuje neuroprotektivní účinky a působí proti rakovinným buňkám. ^{15, 16}

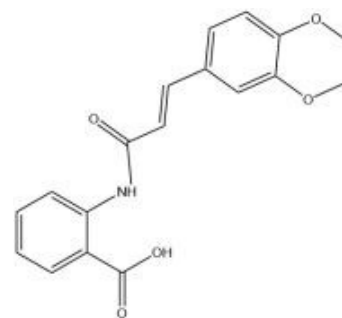
Sekrece melatoninu klesá v průběhu stárnutí. Snížené hladiny melatoninu jsou pozorovány také u některých onemocnění, jako je demence, poruchy nálady, rakovina nebo diabetes mellitus 2. typu.¹⁷

2.1.3 Využití tryptofanu a jeho metabolitů jako potencionálních léčiv

Zejména kynurenová dráha je v současnosti předmětem mnoha biomedicínských výzkumů. Zásahem do jejího průběhu lze ovlivnit celou řadu pochodů v lidském těle, které jsou spojeny mimo jiné se zánětlivými onemocněními. Zánět může při těchto onemocněních vznikat primárně, ale i sekundárně (u degenerativních onemocnění).^{3,6}

Při vývoji léčiv, regulujících průběh kynurenové dráhy, rozeznáváme dva hlavní přístupy. Jednou z možností je vývoj analog kynureninu působících neuroprotektivně. Další cíl je potom zaměřen na inhibici klíčových enzymů syntézy neurotoxických metabolitů, především kyseliny chinolinové.^{3,6}

Jedním ze zkoumaných analog je tranilast. Jedná se o analog kyseliny anthranilové, který dokáže inhibovat IgE indukované uvolňování histaminu z mastocytů. Používá se v terapii zánětlivých onemocnění včetně bronchiálního astmatu, atopické dermatitidy a alergické konjunktivitidy. Do budoucna se předpokládá jeho přínos také v léčbě dnave artritidy, neurodegenerativních onemocnění nebo diabetu mellitu 2. typu.^{6,18}



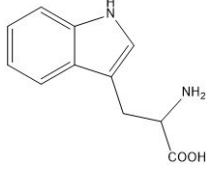
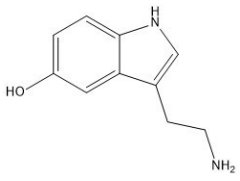
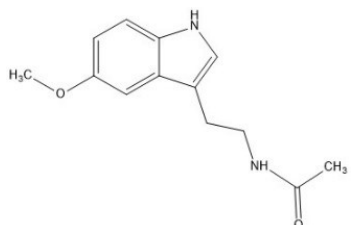
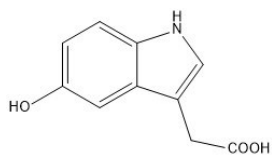
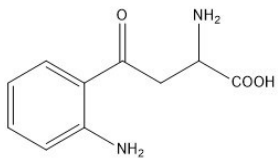
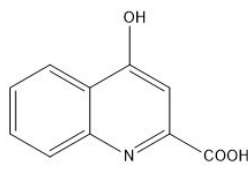
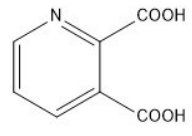
Obr. 3 Struktura tranilastu

Nejvýznamnějším cílem působení léčiv v kynurenové dráze je kynurenin monooxygenasa (KMO), jejíž exprese se zvyšuje působením prozánětlivých cytokinů. Její inhibicí dochází jednak ke snížení syntézy neurotoxických metabolitů 3-hydroxykynureninu a kyseliny chinolinové, ale také vzestupu hladiny neuroprotektivní kyseliny kynurenové a kyseliny anthranilové. Inhibitory KMO by mohly znamenat nový přínos v léčbě neurodegenerativních onemocnění a schizofrenie.^{3,6,8}

Dalšími významnými inhibitory jsou inhibitory IDO, jejíž exprese je ovlivněna zejména cytokiny a oxidem dusnatým. Inhibitory IDO by mohly být přínosné v terapii rakoviny, autoimunitních chorob, neurologických poruch a neurodegenerativních onemocněních.^{3,6}

2.1.4 Fyzikálně chemické vlastnosti tryptofanu a jeho metabolitů

Tab. 1 Fyzikálně chemické vlastnosti tryptofanu a jeho metabolitů (hodnoty pKa a log P byly vypočítány pomocí programu ChemDraw 18.0 s výjimkou pKa melatoninu) ^{10, 11, 13, 18–21}

Látka	M [g/mol]	pKa	log P
tryptofan 	204,229	10,012 2,094	0,32
serotonin 	176,218	10,456 9,741	0,51
melatonin 	232,283	16,51 - 0,69	0,71
5-hydroxyindol-3-octová kyselina 	191,186	9,932 4,135	0,69
kynurenin 	208,217	9,076 2,087	- 0,82
kynurenová kyselina 	189,170	7,659 2,958	1,71
chinolinová kyselina 	167,120	2,317 2,697	0,23

2.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

2.2.1 Obecná charakteristika

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) patří mezi nejrozšířenější separační metody. Současně umožňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu. Mezi další výhody patří také rychlost a citlivost analýzy, spotřeba pouze malého množství vzorku a možnost automatizace.²³

2.2.2 Princip separace

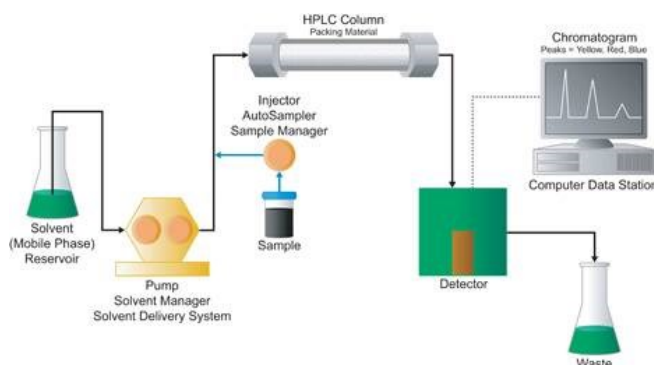
Separace je založena na rozdílné distribuci analyzovaných látek mezi dvě nemísitelné fáze: mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou). Při dělení látek dochází k opakovanému ustalování rovnováhy mezi těmito dvěma fázemi. Mobilní fází je v případě HPLC vždy kapalina, zatímco jako stacionární fáze slouží buď tuhá látka nebo kapalina ukotvená na pevném nosiči.²⁴

Kapalinová chromatografie využívá všechny základní principy separace látek ze směsí. Založena je zejména na mechanismu adsorpce, rozdělování, výměně iontů, vylučování nebo stereochemických interakcích.¹

2.2.3 Instrumentace v HPLC

Kapalinový chromatograf se skládá z těchto částí:

- Zásobníky mobilní fáze
- Degasser (odplyňovač)
- Směšovač
- Vysokotlaké čerpadlo
- Autosampler/manuální dávkovací ventil
- Chromatografická kolona
- Detektor
- Počítač a software²⁴



Obr. 4 Základní schéma HPLC systému²⁵

Mobilní fáze je do systému přiváděna z jednoho nebo více zásobníků, které jsou vybaveny speciálními filtry sloužícími k zachycení nečistot před vstupem mobilní fáze do systému. Mobilní fáze může mít buď konstantní složení při použití izokratické eluce nebo proměnlivé, v případě eluce gradientové.²⁴

K odstranění rozpuštěných plynů v mobilní fázi a ke snížení možnosti vzniku bublin v systému během separace se používá odplyňovač neboli degasser. Odplynění mobilní fáze je důležité především u vody a ostatních polárních rozpouštědel, a to zejména při gradientové eluci.²⁶

V případě izokratické eluce je mobilní fáze vedena ze zásobníku do vysokotlakého čerpadla. Pokud se jedná o eluci gradientovou, jsou jednotlivé složky mobilní fáze nejprve smíseny ve směšovači, který je umístěn před vysokotlakým čerpadlem, případně může být každá složka mobilní fáze přiváděna pomocí vlastního vysokotlakého čerpadla do směšovací komůrky před kolonou.²⁴

Mobilní fáze je dále unášena přes dávkovací zařízení do chromatografické kolony. Každou kolonu tvoří tělo a koncovka. Obvykle jsou používány kolony o vnitřním průměru 2,1 až 5 mm, délce 10 až 300 mm a plněné částicemi o velikosti 1 až 10 μm .²⁴

Dávkovací zařízení je schopno pracovat při vysokém tlaku. Vzorek může být dávkován buď manuálním smyčkovým, nebo automatickým dávkovačem (tzv. autosamplerem), který je v dnešní době využíván daleko častěji. Autosampler je spojen se zásobníkem vzorků, ve kterém jsou umístěny skleněné nebo plastové vialky (nejčastěji o objemu 2 ml).^{1,24}

Vzorek je pomocí mobilní fáze unášen na kolonu, která je přímo spojena s detektorem. Za detektorem může být na výstupu zařazen ještě sběrač jednotlivých frakcí. Signál z detektoru je veden do počítače, kde je vyhodnocován pomocí vhodného softwaru.²⁴

2.2.4 Stacionární fáze

Stacionární fáze je náplň chromatografické kolony, na které dochází k separaci. Mezi obecné požadavky, které by stacionární fáze měly splňovat, patří chemická a teplotní stabilita, nesmí reagovat s mobilní fází a ani se v ní rozpouštět. Podle chemického složení lze stacionární fáze rozdělit na: stacionární fáze na bázi silikagelu, na bázi kovových iontů, polymerní stacionární fáze, hybridní stacionární fáze a stacionární fáze na bázi grafitového uhlíku.²⁴

2.2.4.1 Stacionární fáze na bázi silikagelu

Nejdéle používanou stacionární fází v HPLC je nemodifikovaný silikagel, na jehož povrchu jsou přístupné silanolové skupiny, které umožňují navázání celé řady ligandů. Mezi výhody silikagelu patří vysoká mechanická odolnost, která umožňuje separaci za

vysokých tlaků a také inertnost v přítomnosti organických rozpouštědel. Nevýhodou je rozpustnost silikagelových částic při pH vyšším než 8 a hydrolyza povrchově vázaných skupin při pH nižším než 2. Působením vyšší teploty dochází k degradaci silikagelu.^{24,27}

2.2.4.2 Stacionární fáze na bázi kovových iontů

Oproti silikagelu je jejich výhodou daleko lepší chemická stabilita. Uplatnění mají zejména: oxid zirkoničitý, oxid hlinitý a oxid titaničitý. Lepší stabilita umožňuje práci v celém rozsahu pH a při vysokých teplotách.²⁴

2.2.4.3 Polymerní stacionární fáze

Výhodou polymerních stacionárních fází je stabilita v celém rozsahu pH a vysoká teplotní stabilita. Omezením může být nižší maximální pracovní tlak na koloně a smršťování nebo bobtnání částic polymeru při použití mobilní fáze s vysokým obsahem vody. Nejčastěji jsou využívány kopolymer styrenu a divinylbenzenu nebo polyvinylalkohol a metakryláty.^{16,19}

2.2.4.4 Hybridní stacionární fáze

Kombinací anorganického silikagelu a organického organosilanu vznikly hybridní stacionární fáze. Spojují výhodné vlastnosti silikagelu a polymeru, kterými jsou vysoká mechanická, chemická i teplotní stabilita.²⁴

2.2.4.5 Stacionární fáze na bázi grafitového uhlíku

Tyto stacionární fáze mají velmi dobrou mechanickou odolnost a chromatografickou účinnost. Další výhodou je jejich stabilita v celém rozsahu pH a také vůči vysokým teplotám.²⁴

2.2.5 Základní separační módy

2.2.5.1 Chromatografie na normálních fázích (NP-LC)

Pro separaci jsou používány polární stacionární fáze, nejčastěji tvořeny čistým silikagelem, který může být také modifikován polární funkční skupinou (-CN, -NH₂, diol, PEG, -NO₂). Mobilní fáze je obvykle méně polární než fáze stacionární. Nejčastěji se používají organická nepolární rozpouštědla.^{24,28}

Mechanismus retence je založen na soutěži mezi dělenou látkou a mobilní fází o adsorpční místa na povrchu sorbentu. Retence látek na koloně se zvyšuje s klesající polaritou mobilní fáze, a tak jsou polární analyty zadržovány silněji než nepolární.^{24, 28}

2.2.5.2 Chromatografie na reverzních fázích (RP-LC)

Chromatografie na reverzních fázích využívá polární mobilní fázi, kterou obvykle tvoří směs vody s přidavkem pufru a polárního organického rozpouštědla, nejčastěji methanolu nebo acetonitrilu. Tato rozpouštědla jsou nejvíce preferována kvůli svým výhodným vlastnostem, jako je dobrá mísitelnost s vodou, nízká viskozita, malá absorbance při nízkých vlnových délkách a nízká chemická reaktivita. Eluční síla mobilní fáze roste s klesající polaritou organického rozpouštědla.^{24, 29}

Stacionární fáze vykazují nepolární charakter. Obvykle se jedná o silikagel modifikovaný pomocí uhlíkové složky C18. Dalšími typickými ligandy jsou: C8, fenyl, pentafluorofenyl nebo pentafluoroalkyl. Hlavním retenčním mechanismem jsou nespecifické molekulové interakce mezi analytem a sorbentem. Méně polární analyty jsou více zadržovány na stacionární fázi a pořadí eluce je opačné ve srovnání s chromatografií na normální fázi.²⁴

Chromatografie na reverzní fázi je kvůli své univerzálnosti v současnosti nejvíce využívanou technikou kapalinové chromatografie.²⁴

2.2.5.3 Iontově výměnná chromatografie (IEC)

Při iontově výměnné chromatografii jsou nabitě sloučeniny zadržovány na stacionární fázi (měniči), která je nejčastěji tvořena polymerem s navázanými iontovými skupinami. Retence látek je umožněna dvěma mechanismy. Dochází k distribuci analytu mezi mobilní a stacionární fázi podobně jako při chromatografii na reverzní fázi a dále také k elektrostatickým interakcím ionizovaných funkčních skupin sorbentu a opačně nabitých iontů v mobilní fázi.²⁶

Iontově výměnnou chromatografii lze použít k separaci iontů, ale mnohem častěji je využívána k oddělování organických kyselin a zásad, které jsou ionizovány působením vhodného pH mobilní fáze.²⁶

2.2.5.4 Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)

Hydrofilní interakční chromatografie poskytuje alternativní přístup k efektivní separaci malých polárních sloučenin na polárních stacionárních fázích. Stejně jako

NP-LC, používá HILIC tradiční polární stacionární fáze, zatímco mobilní fáze je podobná režimu RP-LC. HILIC umožňuje také analýzu nabitých látek podobně jako IEC.²⁸

HILIC má oproti chromatografii na normální stacionární fázi mnoho výhod. Je vhodná pro analýzu složitých směsí látek, které se v RP-LC eluují blízko mrtvého retenčního času. Polární sloučeniny jsou navíc dobře rozpustné ve vodné mobilní fázi, což překonává nevýhody špatné rozpustnosti, se kterou se lze setkat v NP-LC.²⁸

Stacionární fáze je nejčastěji tvořena čistým silikagelem nebo silikagelem modifikovaným polárními funkčními skupinami. Mobilní fáze obsahuje s vodou mísitelná rozpouštědla, nejčastěji acetonitril s malým přídavkem vody. Předpokládá se, že dochází k tvorbě tenké vrstvy vody na povrchu stacionární fáze. Analyt se potom rozděluje mezi tuto vrstvu vody a mobilní fázi, kde je naopak vody nedostatek.²⁸

Hydrofilní interakční chromatografie se etablovala jako separační režim volby pro nenabitě vysoce hydrofilní a amfifilní sloučeniny, které jsou příliš polární na to, aby vykazovaly dobrou retenci v RP-LC a nemají dostatečný náboj, který by umožňoval efektivní retenci v IEC.²⁸

2.2.5.5 Molekulová vylučovací chromatografie (SEC)

Vylučovací neboli gelová chromatografie spočívá v separaci látek na základě jejich velikosti. Jako stacionární fáze slouží polymerní gel s póry o určité velikosti. Mobilní fáze unáší analyty různou rychlostí kolonou.²⁶

Molekuly, větší než póry gelu, nemohou pronikat do pórů a procházejí přes kolonu stejnou rychlostí jako mobilní fáze. Objevují se na chromatogramu jako první, protože dochází k jejich stérické exkluzi. Malé molekuly jsou zadržovány nejvíce, protože nastává jejich permeace. Pohybují se kolonou nejpomaleji a eluují se jako poslední.²⁶

Metoda je vhodná pro skupinové separace látek s velkým rozdílem molekulových hmotností, k frakcionaci (rozdělení směsí na základě distribučních konstant) a slouží také ke stanovení molekulové hmotnosti.²⁴

2.2.6 Kolony použité v experimentální části

2.2.6.1 Kolona Kinetex HILIC

Jedná se o kolonu vyplněnou částicemi typu core-shell, které jsou tvořeny pevným jádrem a porézním povrchem. Pevné jádro znemožňuje difúzi analytu dovnitř, což vede

v kombinaci s rovnoměrnou distribucí částic ke vzniku kolony s vysokým počtem teoretických pater.^{30,31}

Mezi výhody kolon s částicemi typu core-shell tak patří zejména vyšší účinnost bez tvorby vysokého zpětného tlaku, lepší rozlišení a rychlejší separace v porovnání s kolonami s plně porézními částicemi. Další výhodou může být také nižší spotřeba rozpouštědel.^{30,31}

Princip HILIC byl již dříve popsán (kapitola. 2.2.5.4).

2.2.6.2 Supelco Ascentis Express F5

Stejně jako v předchozím případě se jedná o kolonu s částicemi s pevným jádrem a porézním povrchem, v tomto případě označované jako fused-core. Částice jsou tvořeny pevným jádrem o průměru 1,7 μm a porézním obalem 0,5 μm . Celková velikost je tedy 2,7 μm . Účinnost kolony je srovnatelná s kolonami plněnými částicemi menšími než 2 μm , ale nárůst tlaku na koloně je poloviční.³²

Sorbent tvoří pentafluorofenylpropylová (PFP) stacionární fáze, která kromě separace v reverzním módu umožňuje také separaci v režimu HILIC. PFP se skládá z fenylového kruhu, který je v důsledku substituce pěti fluory elektrondeficitní. Kromě tvorby π - π a sterických interakcí se uplatňují také interakce polární. Kolonu Ascentis Express F5 lze použít pro bazické, kyselé nebo neutrální sloučeniny.³³

2.2.6.3 Supelco Discovery HS F5

Stacionární fáze je v tomto případě tvořena plně porézními částicemi o velikosti 5 μm . Kolona proto vykazuje menší separační účinnost v porovnání s kolonou Supelco Ascentis Express F5. Stacionární fáze je tvořena silikagelem s navázanými PFP řetězci, poskytující separace v reverzním i HILIC módu.³⁴

Látky se obvykle eluují s podobným retenčním časem jako na kolonách C18, a proto je většina metod snadno přenosná. Kolona Discovery HS F5 vyniká velmi dobrou selektivitou, reprodukovatelností, retencí a rozlišením pro polární analyty i dlouhou životností. Mimo jiné poskytuje vhodné separační podmínky také pro analyty, které nejsou zadržovány na reverzní fázi C18. Je vhodná pro analýzy, v nichž je použito vysoké procento vodné složky v mobilní fázi.^{32,34}

Kolona použitá v této diplomové práci byla již dříve využita při vývoji jiných metod, nebyla tedy zcela nová.

2.2.7 Detektory

Detektory jsou důležitou součástí HPLC systému. Jsou odpovědné za přeměnu chemické nebo fyzikální veličiny na měřitelný signál. Na základě typu použitého detektoru se odvíjí citlivost a selektivita celé analýzy.^{23,35}

Ideálními vlastnostmi HPLC detektoru, které však žádný z nich nespĺňuje, jsou: vysoká citlivost a předvídatelnost, univerzálnost pro všechny analyty, specifita, linearita, spolehlivost a snadnost použití, žádný příspěvek k mimokolonovému rozmývání zón, nedestruktivnost, signál nezávislý na složení mobilní fáze, změně teploty a průtoku a kvalitní informace pro detekované píky.²⁴

Mezi nejvíce používané detektory patří detektory spektrofotometrické, hmotnostní, fluorescenční, elektrochemické, refraktometrické a chemiluminiscenční. V poslední době se do popředí dostává zejména detekce hmotnostní, která s sebou přináší výhody v podobě vysoké citlivosti a univerzálnosti. Pokles naopak zaznamenává využití detektorů refraktometrických.²⁴

2.2.7.1 Spektrofotometrické detektory

Spektrofotometrické detektory jsou nejčastěji používanými detektory v HPLC. Detekce je založena na absorpci záření v oblasti ultrafialového a viditelného světla, tedy v rozsahu vlnových délek 190–800 nm. Kvantitativní vyhodnocení umožňuje Lambert-Beerův zákon, který udává vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy, koncentrací vzorku a velikostí absorpce, vyjádřenou jako absorbance.^{24,35}

Kromě vzorku, je pro optimální citlivost a linearitu důležitý výběr rozpouštědla a mobilní fáze. Některá rozpouštědla není možné použít, protože zvláště při nízkých vlnových délkách se může projevit jejich vlastní absorpce.³⁵

Existují čtyři typy spektrofotometrických detektorů: detektory s fixní vlnovou délkou, které jsou levné a jednoduché, ale dnes se využívají jen v omezené míře, detektory s měnitelnou vlnovou délkou, detektory s programovatelnou vlnovou délkou a detektory s diodovým polem, které snímají celé spektrum v reálném čase.^{24,35}

2.2.7.2 Fluorescenční detektory

Fluorescence je druh luminiscence, tedy schopnost látky vyzařovat světlo. Nejčastěji nastává při návratu elektronu z excitovaného stavu na základní energetickou hladinu. Fluorescenční detektory jsou založeny na měření sekundárního, emisního záření, které látka vydává po absorpci primárního, excitačního záření o vyšší energii (nižší

vlnové délce). Závislost intenzity fluorescence na vlnové délce emitovaných fotonů vyjadřuje emisní spektrum, závislost intenzity fluorescence na vlnové délce excitačního záření, spektrum excitační. Rozdíl mezi vlnovými délkami excitačního a emisního maxima se označuje jako Stokesův posun.^{35, 36}

Fluorescenční detektory se používají pro látky vykazující přirozenou fluorescenci nebo pro ty, které je možné derivatizací s vhodnými činidly převést na látky fluoreskující. Moderní fluorescenční detektory umožňují za pomoci monochromátoru nastavit vlnovou délku excitačního i emisního záření pro dosažení maximální citlivosti detekce jednotlivých analyzovaných látek. Fluorescenční detektory jsou méně univerzální než spektrofotometrické detektory, ale jsou citlivější a selektivnější. Výhodou je také možnost jejich použití při gradientové eluci.²³

2.2.7.3 Elektrochemické detektory

Elektrochemické detektory jsou založeny na měření určité elektrické veličiny, která se mění v závislosti na průchodu látky průtokovou celou detektoru. Používají se pro sloučeniny, které jsou schopné oxidace nebo redukce. Pro takové látky to jsou jedny z nejcitlivějších a nejselektivnějších detektorů.^{24, 35}

V průtokové cele se nacházejí elektrody s vloženým pracovním napětím. Elektrochemické detektory se podle sledované veličiny dělí na ampérometrické, které měří elektrický proud a detektory coulometrické, měřící náboj potřebný k redukci nebo oxidaci látky.²⁴

Jejich použití není příliš široké, protože vyžadují použití vysoce čisté a elektricky vodivé mobilní fáze. Nelze je využít při chromatografii na normální fázi ani při gradientové eluci.^{23, 24, 35}

2.2.7.4 Refraktometrické detektory

Refraktometrické detektory jsou nejstarší detektory používané v HPLC. Mají schopnost měřit rozdílný index lomu mobilní fáze a vzorku. Jsou univerzální, avšak mají řadu nevýhod, jako je malá citlivost, závislost na změně teploty a průtoku mobilní fáze a možnost použití pouze izokratické eluce.^{24, 35}

2.2.7.5 Chemiluminiscenční detektory

Chemiluminiscenční detekce je založena na fluorescenci, která vzniká následkem chemické reakce. Při přechodu molekuly z excitovaného stavu na základní energetickou

hladinu dochází k vyzáření světla. Rozlišují se tři typy chemiluminiscenčních detektorů: detektor specifický pro dusík, síru a detektor univerzální. ²⁴

2.2.7.6 Hmotnostně spektrometrické detektory (MS)

Hmotnostní spektrometry v kombinaci s HPLC patří do skupiny spojených technik, které poskytují také údaje o identitě látky. Jsou to vysoce specifické detektory, jejichž nevýhodou může být vyšší finanční náročnost. ²⁴

Nejprve dochází v ionizátoru k převedení molekuly na ionty. Existuje celá řada ionizačních technik, které dělíme na měkké a tvrdé ionizační techniky. V dalším kroku jsou jednotlivé ionty rozděleny podle poměru hmotnosti a náboje v analyzátoru, kde dochází také k urychlení a fokusaci iontů do detektoru, kterým je elektrodový násobič, fotonásobič nebo Faradayova klec. ²⁴

Hmotnostní detekce je významná zejména pro komplexní vzorky a v poslední době dochází k jejímu nárůstu na úkor spektrofotometrické a fluorescenční detekce. ²⁴

2.2.8 Vyhodnocování výsledků

2.2.8.1 Kvalitativní analýza

Nejběžnějším parametrem sloužícím k identifikaci látek pomocí HPLC jsou retenční charakteristiky, mezi které patří retenční čas a retenční objem. Retenční čas je dán dobou, která uplyne od nástřiku vzorku na kolonu do dosažení maxima eluční křivky. Objem mobilní fáze, která proteče kolonou za tuto dobu, se označuje jako retenční objem.³⁷

Kromě retenčních charakteristik je možné ke kvalitativní analýze použít detektory jako je NMR, MS nebo detektor diodového pole. Tyto detektory poskytují spektra, která slouží k porovnávání se spektry standardních látek případně s knihovnou spekter naměřených za stejných chromatografických podmínek.³⁷

2.2.8.2 Kvantitativní analýza

Základem pro kvantitativní vyhodnocení analyzované látky je určení plochy píku pomocí chromatografického softwaru a nalezení vztahu mezi touto plochou a množstvím eluované látky. Pro vyhodnocení plochy píku standardu i analyzované látky musí být použita stejná metoda.³⁷

Závislost mezi naměřenou plochou a neznámou koncentrací je nutné určit experimentálně porovnáním se standardem. Mezi nejčastější metody patří: metoda vnějšího standardu, metoda vnitřního standardu, metoda přídatku standardu a metoda normalizace.³⁷

Metoda vnějšího standardu

Metoda vnějšího standardu je nejjednodušším způsobem určení neznámé koncentrace vzorku. Analyzována je série standardů o známé, avšak různé koncentraci. Jejich plochy píků se potom porovnávají s píkem vzorku. Nejčastěji se k vyhodnocení používá metoda kalibrační křivky. Předpokladem je přímá úměrnost mezi plochou píku a koncentrací jak u vzorku, tak u standardu.³⁷

Metoda vnitřního standardu

Od metody vnějšího standardu se metoda vnitřního standardu liší tím, že je standard o známé koncentraci přidán ve stejném množství k analyzovanému roztoku standardu a stejně tak i k roztoku vzorku. Výpočet koncentrace vzorku se potom provádí stejným způsobem.³⁷

Vnitřní standard musí splňovat určité požadavky: musí se eluovat v blízkosti sledované sloučeniny, musí mít podobné fyzikálně-chemické vlastnosti, být dostatečně stabilní, mít požadovanou čistotu a odezva detekce analytu a vnitřního standardu by měla být podobná. Většinou se jedná o látku strukturně podobnou, např. izomer. ^{26, 37}

Metoda vnitřního standardu se s výhodou používá zejména v případech, kdy je nutná složitá úprava vzorku před analýzou. ²⁶

Metoda přidavku standardu

Metoda přidavku standardu spočívá v přidání známého množství stejné látky, u které má být stanovena koncentrace k analyzovanému vzorku. Metoda přidavku standardu je vhodná zejména v případě komplexních vzorků, kdy je obtížné získat slepý vzorek. Metoda má dvě varianty: metoda jednoho přidavku a metoda více přidavků standardu. ^{26, 37}

Metoda normalizace

Obsah analyzované látky se vypočítá stanovením plochy odpovídajícího píku jako procenta z celkové plochy všech píků. Do celkové plochy se nezapočítávají plochy píků rozpouštědel, zkoumadel nebo píků mobilní fáze nebo matrice vzorku a píky, jejichž plocha je nižší nebo rovna limitu zanedbatelnosti. Nevýhodou metody může být různá odezva detektoru pro jednotlivé analyty, což lze vyřešit použitím korekčních faktorů. Pro jejich znalost je však nutná úplná identifikace všech píků v chromatogramu. Metoda je často používaná při stanovení čistoty farmaceutických substancí. ^{1, 26, 37}

2.2.9 Validace

Validace analytické metody je proces, kterým se pomocí laboratorních studií stanoví, že výkonnostní charakteristiky metody splňují požadavky na zamýšlené analytické použití. Ověření se vyžaduje u každé nové nebo změněné metody. ³⁸

Validace může být provedena podle směrnic mnoha organizací. Jedná se například o doporučení harmonizovaných předpisů ICH (The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use), směrnice FDA (Food and Drug Administration), EMA (European Medicines Agency) nebo IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). ³⁷

Mezi validační parametry patří podle předpisu ICH: selektivita, linearita, rozsah, správnost, přesnost, limit detekce a kvantifikace, robustnost a test způsobilosti

systemu. Podle směrnice FDA se k validačním parametrům dále řadí: citlivost, výtěžnost, stabilita a diluční efekty.^{39, 40}

2.2.9.1 Selektivita (Selectivity)

Selektivita je schopnost metody kvalitativně i kvantitativně zanalyzovat vzorek i v přítomnosti látek, které by mohly interferovat (např. nečistoty, degradační produkty, složky matrice atd.). Někdy se používá také označení specifita (specificity), které je ale nepřesné. Selektivita je hodnocena analýzou alespoň šesti vzorků blanku (bez přítomnosti analytu) vhodné biologické matrice, ve kterých nesmí být přítomny píky interferující s píky analytů.^{37, 40}

2.2.9.2 Správnost (Accuracy)

Správnost analytické metody vyjadřuje blízkost shody mezi naměřenou hodnotou a akceptovanou referenční hodnotou. Rozdíl mezi výsledkem měření a přijatou referenční hodnotou je označován jako chyba výsledku. Rozdíl mezi střední hodnotou výsledků zkoušek a přijatou referenční hodnotou je nazýván odchylka.^{37, 39}

Odchylka může nabývat kladných i záporných hodnot a pro bioanalytické hodnoty se musí pohybovat v rozmezí $\pm 15\%$ od referenční hodnoty. Výjimkou je limit kvantifikace, v jehož případě se odchylka může lišit o $\pm 20\%$. Správnost by podle FDA měla být testována analýzou minimálně pěti vzorků na čtyřech koncentračních úrovních (spodní limit kvantifikace, nízká, střední a vysoká koncentrace). Podle EMA analýzou alespoň pěti vzorků na čtyřech koncentračních úrovních pokrývajících celý rozsah metody.^{37, 40, 41}

2.2.9.3 Přesnost (Precision)

Přesnost analytické metody popisuje míru shody koncentrací získaných ze série měření stejných homogenních vzorků za předepsaných podmínek. Je definována relativní směrodatnou odchylkou a uvádí se v procentech. Rozlišuje se přesnost v rámci jedné série analýz a přesnost mezi různými sériemi analýz.⁴¹

FDA požaduje, aby se relativní směrodatná odchylka pohybovala v rozmezí $\pm 15\%$, na spodním limitu kvantifikace se jedná o $\pm 20\%$. Analýza by měla být provedena pomocí stejné série vzorků jako při validaci správnosti analýzou minimálně pěti vzorků na čtyřech koncentračních úrovních.⁴⁰

Přesnost může být dle ICH vyjádřena jako:

- a) *Opakovatelnost (repeatability)*: vyjadřuje přesnost za stejných provozních podmínek v krátkém časovém intervalu
- b) *Mezilehlá přesnost (intermediate precision)*: vyjadřuje variace v rámci jedné laboratoře (různí analytici, dny, zařízení atd.)
- c) *Reprodukovatelnost (reproducibility)*: vyjadřuje přesnost mezi laboratořemi ³⁹

2.2.9.4 Výtěžnost (Recovery)

Výtěžnost se vztahuje na účinnost extrakce analytického procesu. Jedná se o poměr množství analytu získaného analytickou metodou k přijaté referenční hodnotě. Výtěžnost nemusí být 100%, ale měla by být konzistentní a reprodukovatelná. ⁴⁰

2.2.9.5 Limit detekce (Limit of detection) a limit kvantifikace (Limit of quantification)

Limit detekce (LOD) analytické metody je nejnížší množství analytu ve vzorku, které lze detekovat a nemusí být nutně umožněna jeho kvantifikace. Limit kvantifikace (LOQ) je nejnížší množství analytu ve vzorku, které lze kvantitativně stanovit s vhodnou správností a přesností. LOQ se používá zejména pro stanovení nečistot nebo rozkladných produktů. ³⁹

Pro výpočet LOD a LOQ se nejčastěji využívá poměr signálu k šumu, který se vypočítá podle vzorce: $S/N = \frac{2H}{h}$, kde H označuje výšku píku a h rozpětí šumu na chromatogramu. Poměr signálu k šumu mezi 3 nebo 2 : 1 se obecně považuje za přijatelný pro odhad detekčního limitu. Pro limit kvantifikace by měl být S/N roven 10 : 1. ^{1, 39}

Mezi další možnosti stanovení LOD a LOQ patří výpočet pomocí směrodatné odchylky odezvy, směrnice kalibrační přímky, směrodatné odchylky odezvy blanku nebo směrodatné odchylky posunutí. ³⁷

2.2.9.6 Citlivost (Sensitivity)

Citlivost je definována spodním limitem kvantifikace (LLOQ). Metoda by měla být vyvinuta a validována tak, aby byla schopna splnit požadavky nezbytné pro zamýšlené studijní vzorky. Vyhodnocení LLOQ lze provést samostatně nebo jako součást posouzení správnosti a přesnosti kalibračního rozsahu. ⁴⁰

2.2.9.7 Linearita (Linearity)

Linearita analytické metody je schopnost v daném rozsahu získat odezvu detektoru, která je přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku. Lineární závislost dvou náhodných

proměnných lze matematicky vyhodnotit metodou lineární regrese: $y = a + bx$, kde a je úsek na ose y a parametr b směrnice kalibrační přímky.^{37, 39}

Nejčastějším způsobem hodnocení linearity je korelační koeficient (R). Při lineární závislosti nabývá hodnot ± 1 . Čím více se korelační koeficient blíží jedné, tím jsou naměřená data lépe proložena přímkou a závislost obou proměnných je těsnější. Pro stanovení linearity se doporučuje příprava minimálně pěti kalibračních roztoků o různých koncentracích pokrývajících rozsah metody.³⁷

2.2.9.8 Rozsah (Range)

Rozsah je obvykle odvozen ze studií linearity a závisí na zamýšleném použití metody. Jedná se o uzavřený interval hodnot měřené veličiny, pro který byla validací potvrzena přijatelná linearita, správnost a přesnost. Interval je obvykle ohraničen spodním a horním limitem kvantifikace.^{37, 39}

2.2.9.9 Robustnost (Robustness)

Robustnost analytického postupu je mírou jeho schopnosti zůstat nedotčen malými, ale úmyslnými změnami parametrů metody a poskytuje známku jeho spolehlivosti. Změna podmínek může nastat např. při mezilaboratorních zkouškách (jiná laboratoř, analytik) nebo změnou podmínek v jedné laboratoři (teplota, koncentrace atd.). Jsou-li měření citlivá na změny v analytických podmínkách, měly by být podmínky vhodně kontrolovány.^{37, 39}

2.2.9.10 Stabilita

Stabilita vyjadřuje stálost analytu v dané matici při skladování za specifických podmínek v určitých časových intervalech. Stabilita analytu je relevantní pouze pro konkrétní matici a obalový materiál, pro které byla testována. Hodnocena by měla být za podmínek, které co nejvíce odpovídají reálnému zacházení se vzorkem. Pro validaci jsou požadovány alespoň tři alikvótní vzorky o nízké a vysoké koncentraci. Odchylka by měla odpovídat $\pm 15 \%$.⁴⁰

3 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout HPLC metodu pro hodnocení tryptofanu a jeho metabolitů (serotoninu, kynureninu, kyseliny kynurenové a kyseliny 5-hydroxindol-3-oxové) a prozkoumat možnosti hodnocení kyseliny chinolinové a melatoninu. Vývoj metody spočíval v optimalizaci chromatografických podmínek za použití spektrofotometrické a fluorescenční detekce. Dalším úkolem bylo provést validaci vyvinuté metody. Mezi validační parametry byly zahrnuty: selektivita, citlivost, linearita, správnost, přesnost, opakovatelnost a stabilita.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

- Acetonitril (HPLC grade), Sigma-Aldrich, Německo
- Amoniak vodný roztok 25-29 % (p.a.), Penta s.r.o., Česká republika
- Hydroxid sodný koncentrovaný RS – ČL 2017
- Krebsův živný roztok (viz. dále)
- Kyselina 2,3-pyridindikarboxylová (kyselina chinolinová), Sigma-Aldrich, Německo
- Kyselina 5-hydroxyindol-3-octová, Sigma-Aldrich, Německo
- Kyselina kynurenová, Sigma-Aldrich, Německo
- Kyselina octová 99 %, Penta s.r.o., Česká republika
- L-kynurenin, Sigma-Aldrich, Německo
- L-tryptofan, Sigma, Německo
- Melatonin, Sigma-Aldrich, Německo
- Methanol, VWR Chemicals, USA
- Serotonin, Sigma-Aldrich, Německo
- Síran měďnatý pentahydrát p.a. Penta s.r.o., Česká republika
- Triethylamin p.a. Penta s.r.o., Česká republika
- Voda čištěná reverzní osmózou

Krebsův živný roztok

Krebsův živný roztok byl připravován a ředěn na Katedře farmakologie a toxikologie.

Uchováván byl v mrazničce.

Krebsův zásobní roztok byl připravován do zásoby a uchováván v lednici.

Tab. 2 Krebsův zásobní roztok ⁴²

Látka	na 100 ml ž.r.
NaCl	6,90 g
KCl	0,35 g
NaHCO ₃	2,10 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	0,14 g
Glukosa	1,00 g

Zásobní roztok CaCl₂.2H₂O – 2,94 g CaCl₂.2H₂O do 100 ml destilované vody. ⁴²

Zásobní roztok MgCl₂.6H₂O – 2,44 g MgCl₂.6H₂O do 100 ml destilované vody. ⁴²

V čase potřeby se naředí Krebsův zásobní roztok (např. na množství 100 ml). ⁴²

Postup přípravy Krebsova živného roztoku:

1. 10 ml Krebsova zásobního roztoku + 90 ml destilované vody
2. Přidat 0,7 ml zásobního roztoku CaCl₂.2H₂O + 0,5 ml zásobního roztoku MgCl₂.6H₂O
3. Zamíchat, změřit/upravit pH
4. Přidat 0,1 ml heparinu a 1 g dextransu
5. Zamíchat, zfiltrvat, předeřtát ⁴²

4.2 Přístrojové vybavení a pomůcky

4.2.1 Chromatografické kolony

- Kinetex HILIC, 100 Å, 100 × 3,0 mm, 2,6 µm, Phenomenex (USA)
- Supelco Ascentis Express F5, 150 × 3,0 mm, 2,7 µm, Sigma-Aldrich (USA)
- Supelco Discovery HS F5, 150 × 4,6 mm, 5 µm, Sigma-Aldrich (USA)

4.2.2 Přístroje

Podle možností laboratoře, byly využívány tři HPLC sestavy:

Tab. 3 HPLC sestava č.1

UFLC XR; Shimadzu, Japonsko	
Řídící jednotka	CBM-20A
Degasser	DGU-20A ₃
Čerpadlo	LC-20AD XR
Autosampler	SIL-20AC XR
Termostat kolony	CTO-20AC
Detektory	UV-VIS SPD-20A

Tab. 4 HPLC sestava č. 2

UFLC; Shimadzu, Japonsko	
Řídící jednotka	CBM-20A
Degasser	DGU-20A ₃
Čerpadlo	LC-20AD
Autosampler	SIL-20AC HT
Termostat kolony	CTO-20AC
Detektory	UV-VIS SPD-20A

Validace provedena na přístroji:

Tab. 5 HPLC sestava č. 3

HPLC; Shimadzu, Japonsko	
Řídící jednotka	CBM-20A
Degasser	DGU-20A ₃
Čerpadlo	LC-20AD
Autosampler	SIL-20AC
Termostat kolony	CTO-20AC
Detektory	UV-VIS SPD-20A
	FLUORESCENCE RF-10A _{XL}

- Analytické váhy – Sartorius CPA22D-0CE, Německo
- pH metr – SCHOTT CG 843, Schott Instruments GmbH, Německo
- Magnetická míchačka – Color squid, Ika Werke, Německo
- Třepačka – Vortex, VELP Scientifica, Itálie
- Ultrazvuková lázeň – K 10, Kraintek, Slovensko
- Spektrofotometr – UV-2401PC Shimadzu, Japonsko

4.2.3 Laboratorní sklo a pomůcky

Digestoř, kádinky, kyvety, laboratorní lžičky, míchadlo, MS[®] Nylon Membrane Filtre (velikost pórů 0,22 μ m, průměr 47 mm), odměrné válce, automatické pipety a špičky, stojan na zkumavky, skleněné tyčinky, vialky, víčka, septa, zkumavky.

4.3 Obecné postupy

4.3.1 Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze byla připravena smísením 92 objemových dílů 0,1M acetátového pufru o pH 3,5 a 8 objemových dílů acetonitrilu. Acetátový pufr byl připraven smísením 300 ml vody čištěné reverzní osmózou a 1,71 ml 99% kyseliny octové. Následně bylo pH upraveno na pH metru pomocí koncentrovaného hydroxidu sodného na hodnotu 3,5. Takto připravený tlumivý roztok byl přefiltrován. Odměrnými válci byly odměřeny potřebné objemy a mobilní fáze byla smíchána v poměru 8 (pufr) + 92 (acetonitril). Vše bylo důkladně promícháno.

4.3.2 Příprava roztoků

4.3.2.1 Zásobní roztoky tryptofanu a jeho metabolitů

Zásobní roztoky tryptofanu a jeho metabolitů byly připraveny navážením 1 mg příslušné látky, která byla následně rozpuštěna v 1 ml methanolu. Koncentrace těchto roztoků byla 1 mg/ml. Z každého roztoku bylo následně odebráno 100 μ l a doplněno 900 μ l methanolu. Jejich výsledná koncentrace tak činila 0,1 mg/ml. Roztoky byly uchovávány v mrazničce.

4.3.2.2 Zásobní roztok směsného standardu

Ze zásobních roztoků tryptofanu a roztoků jeho metabolitů o koncentraci 0,1 mg/ml bylo odebráno 10 μ l a doplněno methanolem do 1 ml za vzniku roztoků jednotlivých látek o koncentracích 1 μ g/ml. Z takto vzniklých roztoků tryptofanu, serotoninu a kyseliny 5-hydroxyindol-3-octové (případně melatoninu, při vývoji gradientu) bylo dále odebráno 10 μ l, z roztoků kynureninu a kyseliny kynurenové 100 μ l a doplněno do 1 ml methanolem.

Výsledná koncentrace zásobního roztoku směsného standardu byla 10 ng/ml (kynurenin a kyselina kynurenová 100 ng/ml). Roztok byl uchováván v mrazničce.

4.3.3 Příprava roztoků pro validaci metody

4.3.3.1 Selektivita

Pro validaci selektivity vyvinuté metody byly vyhodnoceny chromatogramy zásobního roztoku směsného standardu, blanku (Krebsův živný roztok) a vzorku.

Vzorek byl připraven ze zásobních roztoků tryptofanu a jeho metabolitů o koncentraci 0,1 mg/ml. Další postup byl stejný jako při přípravě zásobního roztoku směsného standardu, avšak jako rozpouštědlo byl namísto methanolu použit Krebsův živný roztok.

4.3.3.2 Citlivost

Od každé látky byly připraveny roztoky o koncentracích 1 ng/ml, 10 ng/ml a 100 ng/ml. Tyto roztoky byly připraveny ředěním zásobních roztoků tryptofanu a jeho metabolitů o koncentraci 0,1 mg/ml. Z roztoku každé látky bylo odebráno 10 μ l a doplněno 990 μ l methanolu za vzniku roztoků o koncentraci 1 μ g/ml.

Ředění roztoků pro stanovení citlivosti je uvedeno v tabulce 6.

Tab. 6 Příprava roztoků pro stanovení citlivosti.

Objem roztoků tryptofanu a jeho metabolitů o koncentraci 1 µg/ml [µl]	Objem MeOH [µl]	Výsledná koncentrace [ng/ml]
100	900	100
10	990	10
1	999	1

4.3.3.3 Linearita

Linearita byla hodnocena na vzorcích standardů o koncentracích na limitu kvantifikace, 5 ng/ml (tryptofan, serotonin, kyselina 5-hydroxyindol-3-octová), 10 ng/ml (kynurenin, tryptofan, serotonin, kyselina 5-hydroxyindol-3-octová), 15 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml a 500 ng/ml (kynurenin, kyselina kynurenová).

Ze zásobních roztoků tryptofanu a jeho metabolitů bylo odebráno 10 µl a doplněno 990 µl methanolu. Výsledná koncentrace takto vzniklých roztoků byla 1 µg/ml. Pro přípravu roztoků o koncentracích na limitu kvantifikace sloužily jako výchozí roztoky, roztoky o koncentraci 100 ng/ml, které byly připraveny odebráním 1 µl ze zásobních roztoků tryptofanu a jeho metabolitů a doplněním 999 µl methanolu. Způsob přípravy je uveden v tabulce 7.

Tab. 7 Příprava roztoků pro validaci linearity.

Analyt	Koncentrace [ng/ml]	Objem zásobního roztoku o koncentraci 100 ng/ml [µl]	Objem MeOH [µl]
Kyn	6,3	63	937
Trp	1,5	15	985
5-HT	0,2	2	998
KynAc	13,4	134	866
5-OHI3Ac	2,9	29	971
		Objem zásobního roztoku o koncentraci 1 µg/ml [µl]	
Trp + 5-HT + 5-OHI3Ac	5	5 + 5 + 5	985
Kyn + Trp + 5-HT + 5-OHI3Ac	10	10 + 10 + 10 + 10	960
5 analytů	15	5 × 15	925
5 analytů	25	5 × 25	875
5 analytů	50	5 × 50	750
5 analytů	100	5 × 100	500
Trp + 5-HT + 5-OHI3Ac	250	250 + 250 + 250	250
Kyn + KynAc	250	250 + 250	500
Kyn + KynAc	500	500 + 500	0

4.3.3.4 Správnost a přesnost

Správnost a přesnost byly hodnoceny na vzorcích o koncentraci 2,9 ng/ml (kyselina 5-hydroxyindol-3-octová), 5 ng/ml (tryptofan, serotonin), 13,4 ng/ml (kyselina kynurenová), 15 ng/ml (kynurenin), 50 ng/ml (tryptofan, serotonin, kyselina 5-hydroxyindol-3-octová), 250 ng/ml a 500 ng/ml (kynurenin, kyselina kynurenová).

Ze zásobních roztoků o koncentraci 0,1 mg/ml byly připraveny vzorky o koncentraci 1 µg/ml a pro kyselinu kynurenovou a 5-hydroxy-3-indol-3-octovou také vzorky o koncentraci 100 ng/ml. Vzorky byly připraveny stejným způsobem jako u hodnocení linearity, avšak jako rozpouštědlo byl namísto methanolu použit Krebsův živný roztok. Každý vzorek byl připraven pětkrát. Podrobný postup přípravy je uvedený v tabulce 8.

Tab. 8 Příprava roztoků pro validaci správnosti a přesnosti

Analyt	Koncentrace [ng/ml]	Objem zásobního roztoku o koncentraci 100 ng/ml [µl]	Objem Krebsova ž. r. [µl]
KynAc	13,4	134	866
5-OHI3Ac	2,9	29	971
		Objem zásobního roztoku o koncentraci 1 µg/ml [µl]	
Trp + 5-HT + (Kyn)	5 (15)	5 + 5 + 15	975
Trp + 5-HT + 5-OHI3Ac	50	50 + 50 + 50	850
Kyn/Trp/5-HT/KynAc/5-OHI3Ac	250	250	750
Kyn	500	500	500
KynAc	500	500	500

4.3.3.5 Opakovatelnost

Opakovatelnost byla hodnocena na třech koncentračních úrovních pro každou látku, po pěti vzorcích od každé koncentrace. Pro jednotlivé analyty byly zvoleny stejné koncentrace jako při validaci správnosti a přesnosti a byl stejný i způsob přípravy roztoků (tab. 8). Rozdíl byl v tom, že od každého vzorku bylo připraveno 5 ml a tento objem byl pomocí pipety alikvotně rozdělen do pěti různých vialek.

4.3.3.6 Stabilita

Stabilita byla testována na třech koncentračních úrovních pro každou látku, po třech vzorcích od každé koncentrace. Byly zvoleny stejné koncentrace jako při validaci správnosti, přesnosti a opakovatelnosti. Příprava vzorků probíhala stejným způsobem jako při hodnocení opakovatelnosti.

4.4 Optimalizace chromatografické metody

Při vývoji metody bylo nejprve nutné nalézt vhodné chromatografické podmínky pro analýzu tryptofanu a jeho metabolitů (serotoninu, kynureninu, kyseliny kynurenové, kyseliny 5-hydroxyindol-3-octové, kyseliny chinolinové, případně melatoninu). Vycházelo se z již dříve vyvinuté metody na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy FaF UK v HK.

Parametry původní metody:

- *Kolona:* Kinetex EVO C18
- *Rozměry kolony:* délka 150 mm, vnitřní průměr 3 mm
- *Stacionární fáze:* silikagel C18 (velikost částic 5 μm , velikost pórů 100 \AA)
- *Předkolona:* OPTI-GUARD C18, délka 1 mm
- *MF A:* voda + octanový tlumivý roztok 0,1M pH 4,5/MeOH (97/3)
- *MF B:* čistý methanol
- *Teplota:* 30 $^{\circ}\text{C}$
- *Objem nástřiku:* 100 μl
- *Průtoková rychlost:* 0,5 ml/min
- *Detekce:* spektrofotometrický a fluorimetrický detektor
- *Eluce:* gradientová
- *Celková doba analýzy:* 30 minut ⁴²

Metodu bylo vhodné optimalizovat především kvůli minimální retenci kyseliny chinolinové. Testována byla celá řada mobilních fází, o různém složení a pH. Zkoušeny byly odlišné analytické kolony a typy stacionárních fází. Proměřena byla také UV spektra jednotlivých látek a upraven byl i objem nástřiku. Zachována byla teplota analýzy 30 $^{\circ}\text{C}$, průtoková rychlost 0,5 ml/min a typ detekce, které se jevily jako optimální.

Pro separaci byla nejprve testována kolona Kinetex HILIC (100 \AA , 100 \times 3,0 mm, 2,6 μm). Separace látek na této koloně však byla neúspěšná. Z tohoto důvodu se přešlo na kolonu s reverzní stacionární fází Supelco Discovery HS F5 (150 \times 4,6 mm, 5 μm). Jednotlivé analyty se na této koloně podařilo separovat, avšak kyselina chinolinová se stále eluovala s mrtvým retenčním časem. Během experimentů došlo k degradaci kolony, což se projevovalo zejména vzestupem tlaku nad únosnou míru. Bohužel ani regenerace dle návodu nepřinesla dlouhodobé zlepšení, a proto se jako náhrada použila kolona

s podobným sorbentem – Supelco Ascentis Express F5. (150 × 3 mm, 2,7 μm). Na této koloně byla metoda validována.

Zejména z důvodu vysoce odlišných acidobazických vlastností jednotlivých analytů byla zkoušena celá řada mobilních fází o různých pH v rozsahu 3,2 – 7. Jako pufrů byly postupně použity octan amonný, mravenčan amonný, fosfátový a acetátový pufr. K úpravě pH sloužil především koncentrovaný hydroxid sodný, ale pokus byl proveden také s triethylaminem. Jako organická složka mobilní fáze byl využíván methanol nebo acetonitril.

Byl zvolen izokratický typ eluce, která dostačovala pro separaci tryptofanu, serotoninu, kynureninu, kyseliny kynurenové a 5-hydroxyindol-3-octové v poměrně krátkém čase. Pro případ nutnosti separace melatoninu byla vyvinutá metoda doplněna o gradient, avšak metoda s gradientovou elucí nebyla validována.

Retence kyseliny chinolinové byla ve všech soustavách velice nízká, žádnou z metod tedy nelze použít pro její hodnocení.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Kolona Kinetex HILIC

Při vývoji metody byla k analýzám na základě literatury vybrána kolona Kinetex HILIC (100 Å, 100 × 3,0 mm, 2,6 µm). Hydrofilní interakční chromatografie byla zvolena zejména s cílem zvýšit retenci kyseliny chinolinové, která byla na reverzní stacionární fázi C18 naprosto nedostatečná.

Veškeré pokusy na této koloně byly prováděny na HPLC sestavě č. 1 (tab. 3). V průběhu vývoje metody byly testovány různé chromatografické podmínky. Nejprve byla zvolena eluce izokratická, přičemž mobilní fáze obsahovala 95–97 % acetonitrilu. Izokratická eluce nepřinesla požadované výsledky, a proto se přešlo k eluci gradientové.

Podle doporučení výrobce kolony byly testovány podmínky sloužící k optimální selektivitě většího množství analytů s různými acidobazickými vlastnostmi. Jako pufrы byly použity: 50mM mravenčan amonný pH 3,2 a 50mM octan amonný pH 5,8 a 4,5. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min. Složení mobilních fází je uvedeno v tabulce 9, zkoušený gradient v tabulce 10.

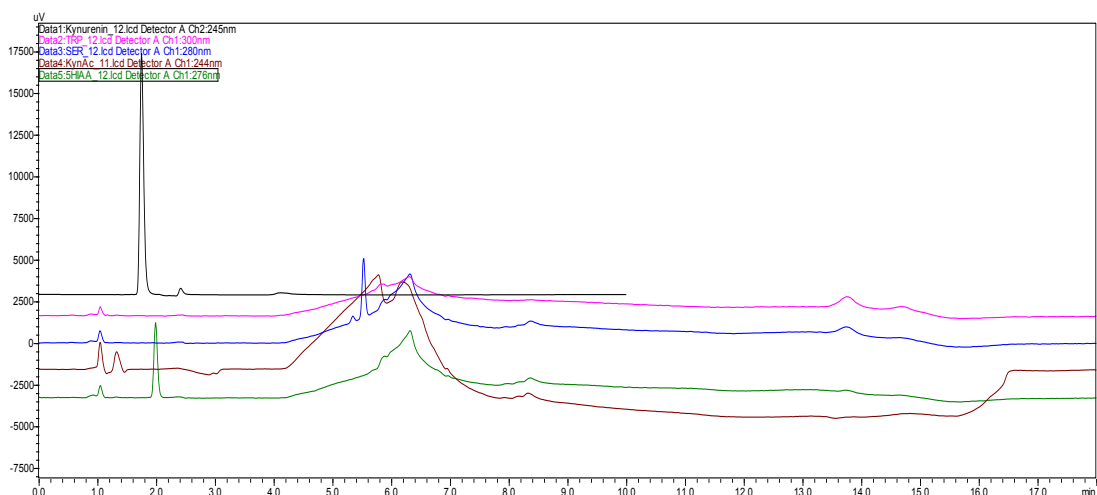
Tab. 9 Složení mobilních fází

MF A	90/10	ACN/pufr
MF B	50/40/10	ACN/H ₂ O/pufr

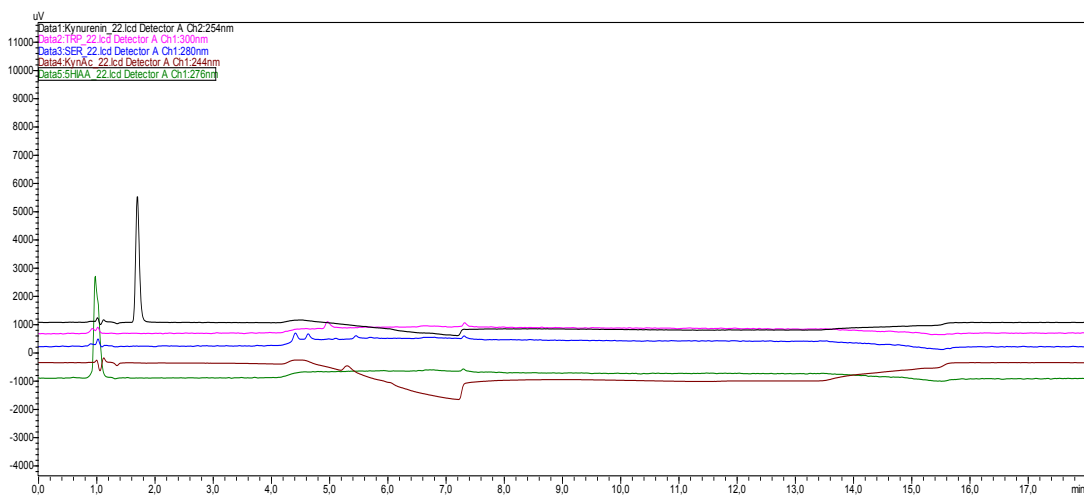
Tab. 10 Zkoušený gradient

Čas [min]	MF A [%]	MF B [%]
0,00 – 2,50	100	0
2,50 – 10,00	100→0	0→100
10,00 – 12,00	0	100
12,00 – 14,00	0→100	100→0
14,00 – 18,00	100	0

Využita byla spektrofotometrická detekce. Pro kyselinu chinolinovou byla maximální absorpce naměřena při vlnových délkách 215 nm, 264 nm, 320 nm a 348 nm. Pro ostatní analyty jsou vlnové délky uvedeny v tabulce 12.



Obr. 6 Shora dolů chromatogram Kyn, Trp, 5-HT, KynAc, 5-OHI3Ac; gradientová eluce; 50mM mravenčan amonný pH 3,2; UV detekce; průtok 0,5 ml/min



Obr. 5 Shora dolů chromatogram Kyn, Trp, 5-HT, KynAc, 5-OHI3Ac; gradientová eluce; pufr 50mM octan amonný pH 5,8; UV detekce; průtok 0,5 ml/min

Kyselina chinolinová vykazovala minimální retenci při jakýchkoliv zkoušených podmínkách. Ani četné pokusy optimalizovat HILIC metodu alespoň pro ostatní látky nevedly k výsledkům, které by byly přinejmenším srovnatelné s výsledky již dříve vyvinuté metody na reverzní fázi.⁴²

Od myšlenky využití HILIC na koloně Kinetex bylo opuštěno. K vývoji metody byla zvolena kolona s jiným sorbentem – Supelco Discovery HS F5.

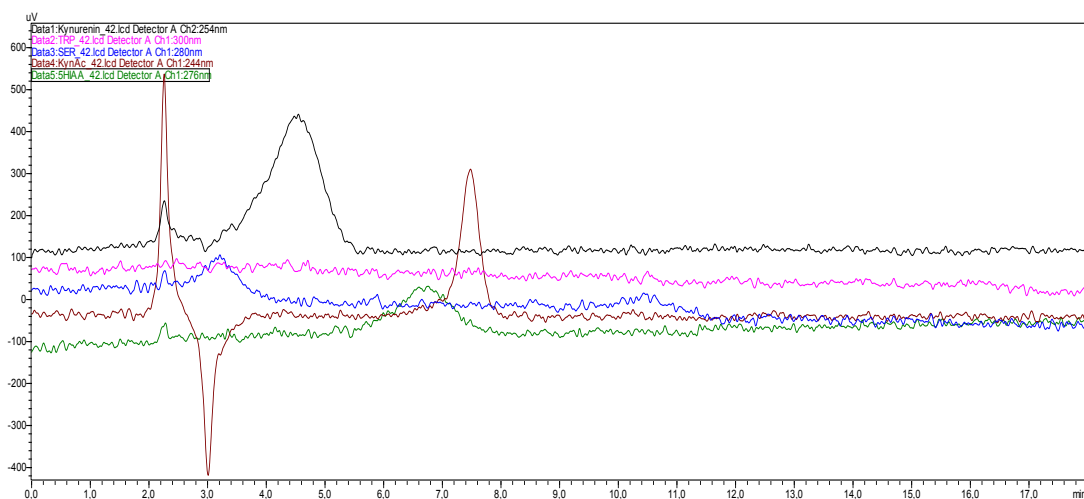
5.2 Kolona Supelco Discovery HS F5

Tato kolona byla vybrána především z důvodu umožnění separace v HILIC, ale také v reverzním separačním módu. Pokusy byly prováděny na HPLC sestavě č. 2 (tab. 4).

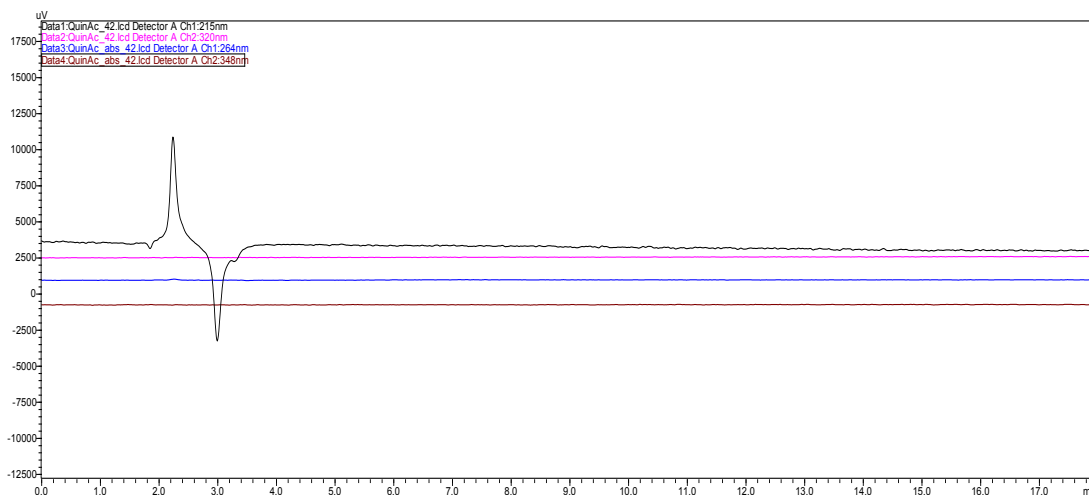
Rozměry kolony (150 × 4,6 mm, 5 μm), a to zejména dvakrát vyšší velikost částic a větší vnitřní průměr, umožnily zvýšit průtokovou rychlost na 1 ml/min, přičemž byl zachován zpětný tlak okolo 30 MPa.

Stejně jako u předchozí kolony byl nejprve vyzkoušen jako tlumivý roztok 50mM mravenčan amonný pH 3,2 s gradientovou elucí.

V další fázi se ustoupilo od HILIC separačního módu, protože kyselina chinolinová stále nevykazovala žádnou retenci. Jako první byly otestovány chromatografické podmínky shodné s parametry již vyvinuté metody (kapitola 4.4.). Byl zvolen vyšší průtok, a to 1 ml/min.



Obr. 6 Shora dolů chromatogram Kyn, Trp, 5-HT, KynAc, 5-OHI3Ac;
UV detekce; průtok 1 ml/min

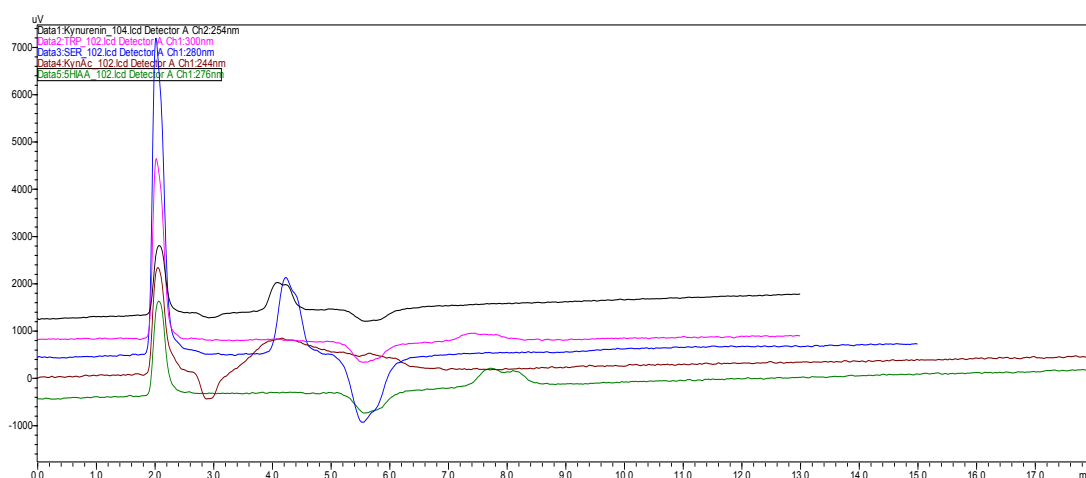


Obr. 7 Chromatogram QuinAc; UV detekce; shora dolů vlnová délka 215 nm,
320 nm, 264 nm, 348 nm; průtok 1 ml/min

Procentuální zastoupení methanolu v mobilní fázi bylo postupně upravováno z 3 % až na 30 %.

Podmínky stále nebyly optimální, jak pro kyselinu chinolinovou, která se na koloně nezadržovala vůbec, tak pro ostatní hodnocené látky. Z důvodu rozličných acidobazických vlastností jednotlivých látek, se tedy přistoupilo k testování mobilních fází o vyšším pH. V důsledku toho musel být změněn tlumivý roztok na fosfátový.

Byly zkoušeny mobilní fáze s obsahem fosfátového tlumivého pufru o pH 7 a 5,6 s 15 % methanolu. K minimalizaci chvostování píků bylo pH mobilní fáze upraveno triethylaminem namísto koncentrovaného hydroxidu sodného.

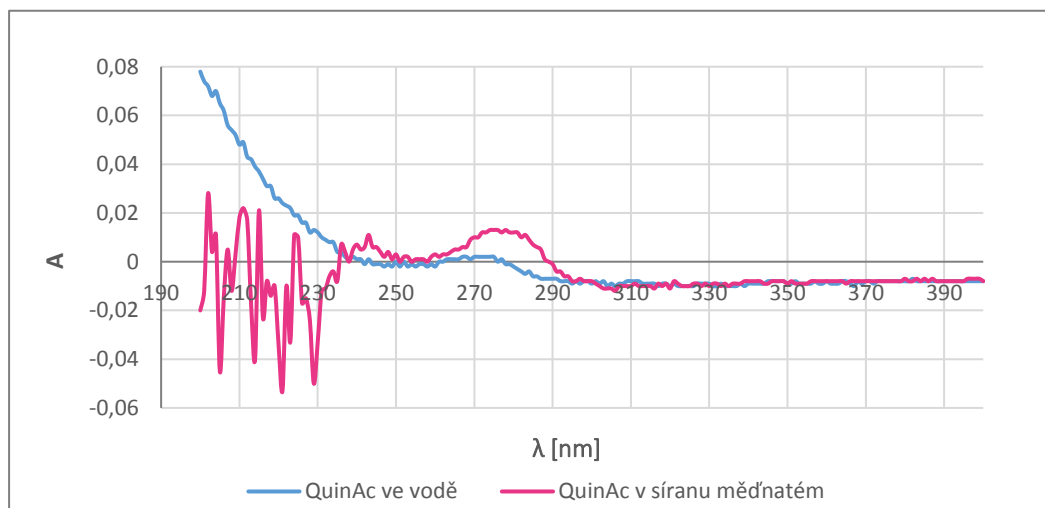


Obr. 8 Shora dolů chromatogram Kyn, Trp, 5-HT, KynAc, 5-OH3Ac; UV detekce; průtok 1 ml/min

Změna pH, ani použití triethylaminu nepřinesly zlepšení, a proto bylo rozhodnuto, navrátit se k pokusům s 0,1M acetátovým pufrem, s nímž se dosavadní výsledky zdály být nejlepší. V této fázi došlo k poškození kolony a vývoj metody musel být přerušen.

Kyselina chinolinová vykazovala minimální retenci při jakýchkoli zkoušených podmínkách, a navíc její detekce byla málo citlivá. Ke zlepšení citlivosti UV detekce byl připraven roztok kyseliny chinolinové o koncentraci 1 µg/ml a jako rozpouštědlo byl použit 1mM roztok $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Předpokládalo se, že Cu^{2+} ionty by mohly s kyselinou chinolinovou vytvořit stabilní komplexy, které by nepodléhaly redoxním reakcím.⁴³

Absorpce byla přeměřena na spektrofotometru a byly porovnány absorpční křivky roztoků kyseliny chinolinové ve vodě a v roztoku 1mM síranu měďnatého. I když podle absorpčních spekter (obr. 9) lze očekávat zlepšení citlivosti, v reálných pokusech se odezva UV detektoru při HPLC analýze dostatečně nezlepšila. V následujících pokusech, se upustilo od vývoje metody, která by zahrnovala kyselinu chinolinovou.

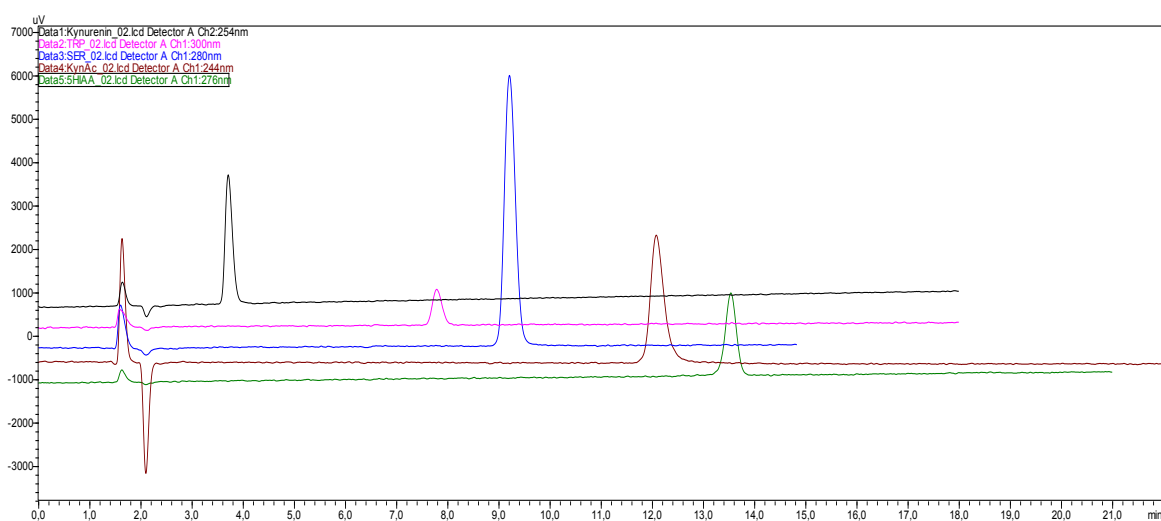


Obr. 9 Absorpční spektrum QuinAc ve vodě a v 1mM síranu měďnatém

5.3 Supelco Ascentis Express F5

Jako alternativa ke koloně Supelco Discovery HS F5 byla zvolena kolona Supelco Ascentis Express F5 se stejnou délkou a typem stacionární fáze, avšak menším vnitřním průměrem a velikostí částic ($150 \times 3,0$ mm, $2,7 \mu\text{m}$). Zejména díky nižší velikosti částic se předpokládalo, že by účinnost separace mohla být lepší než u předchozí kolony.

Pokusy byly prováděny na HPLC sestavě č. 2 (tab. 4). Standardy o koncentraci $0,1 \text{ mg/ml}$ byly nastříkovány v objemu $1 \mu\text{l}$. Průtok byl snížen na $0,5 \text{ ml/min}$. Pokračovalo se v pokusech s mobilní fází tvořenou $0,1\text{M}$ acetátovým pufrům (pH 4; MeOH 10 %).



Obr. 10 Shora dolů chromatogram Kyn, Trp, 5-HT, KynAc, 5-OHI3Ac; UV detekce; průtok $0,5 \text{ ml/min}$

Metoda vykazovala poměrně dobrou separaci látek, problémy však způsoboval velmi vysoký tlak na koloně. V dalším kroku vývoje metody byl methanol zaměněn za acetonitril. Výhodou acetonitrilu je nižší absorpance zejména v kratších vlnových délkách (hodnota UV cut-off pro acetonitril – 190 nm , pro methanol – 205 nm), nižší tlak na koloně při stejném průtoku a při nízké koncentraci také vyšší eluční síla.^{44, 45}

Optimální koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi byla stanovena na 8 %. Dále bylo testováno pH mobilní fáze v rozsahu od $3,2 - 4,5$. Nejlepší separace byla pozorována při pH $3,5$.

Podle zadání nemusela vyvinutá metoda zahrnovat melatonin. V porovnání s ostatními metabolity tryptofanu je melatonin mnohem lipofilnější a jeho izokratická eluce by trvala mnohem déle ($33,2$ minut při stávajících podmínkách). Pro případ, že by

bylo nutné vyhodnotit také melatonin, byl vyvinut gradient, který začíná v sedmé minutě (kapitola 5.7).

5.4 Parametry vyvinuté metody

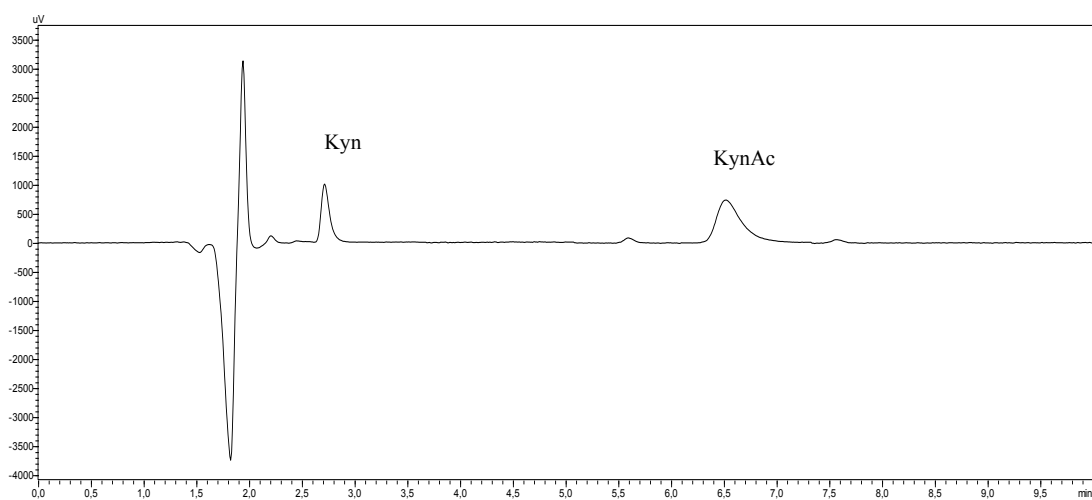
- *Kolona:* Supelco Ascentis Express F5
- *Rozměr kolony:* délka 15 cm; vnitřní průměr 3,0 mm
- *Stacionární fáze:* pentafluorofenylpropyl (velikost částic 2,7 μm)
- *Mobilní fáze:* voda + acetátový pufr 0,1M pH 3,5/ACN (92 /8)
- *Teplota:* 30 °C
- *Objem nástřiku:* 20 μl
- *Rychlost průtoku:* 0,5 ml/min
- *Detekce:* spektrofotometrická a fluorescenční (tab. 12)
- *Eluce:* izokratická
- *Celková doba analýzy:* 10 minut

Tab. 11 Vyvinutá metoda

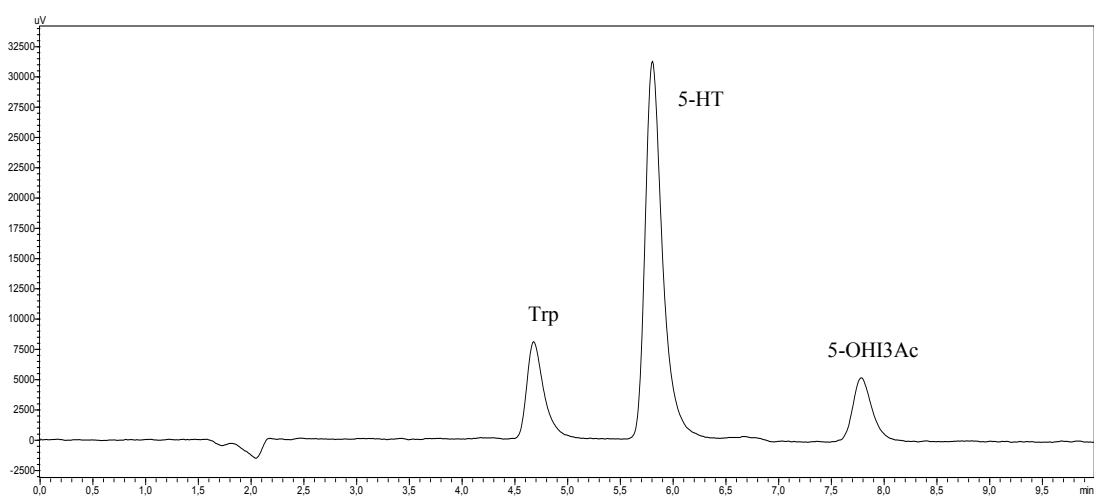
Čas [min]		λ [nm]	Analyt
0,00	UV	254	Kyn
0,00	Emise	334	Trp + 5-HT
0,00	Excitace	280	Trp + 5-HT
3,60	UV	300	Trp
5,40	UV	244	KynAc
6,50	Emise	333	5-OHI3Ac
6,50	Excitace	276	5-OHI3Ac

Tab. 12 Naměřené hodnoty spekter

Analyt	UV [nm]	Ex/Em [nm]
Kyn	254, 369	369/475
KynAc	244	-
Trp	300	280/334
5-HT	280	280/334
5-OHI3Ac	276	276/333



Obr. 11 Chromatogram analyzovaných látek (100 ng/ml); UV detekce

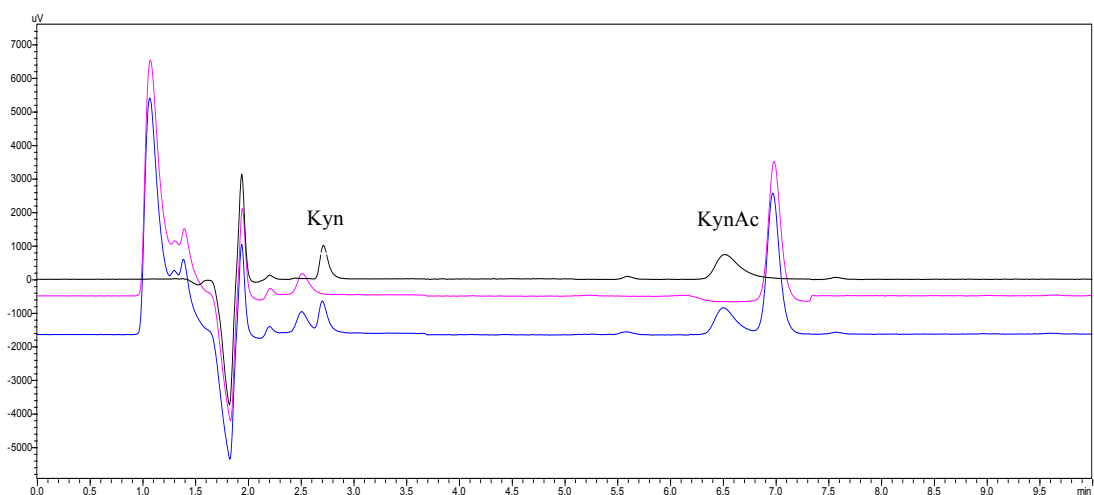


Obr. 12 Chromatogram analyzovaných látek (10 ng/ml); fluorescenční detekce

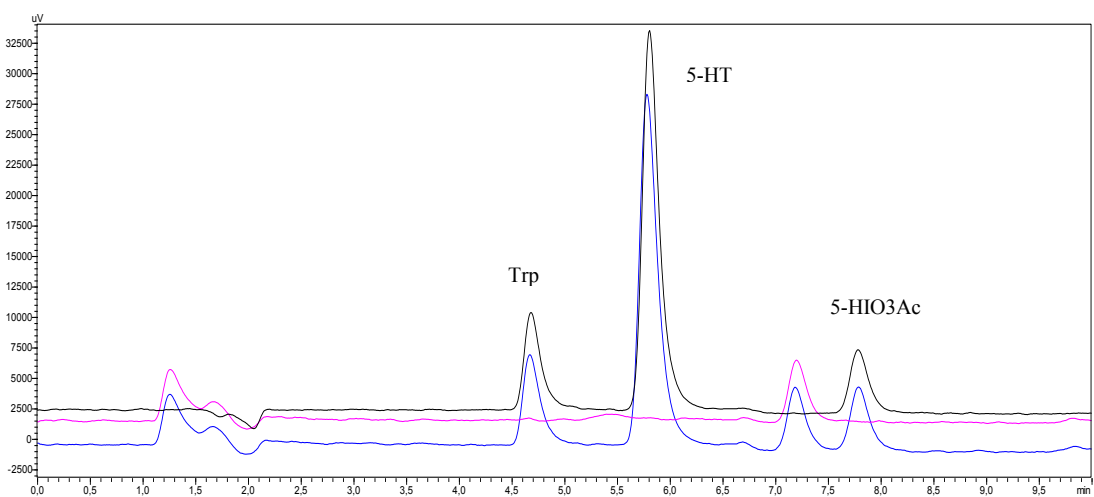
5.5 Validace metody

Metoda byla validována podle směrnic FDA. Hodnocenými parametry byly: selektivita, linearita, správnost, přesnost – opakovatelnost a stabilita. Pro další použití by bylo vhodné posoudit také robustnost.

5.5.1 Selektivita



Obr. 13 Shora dolů chromatogram standardů, blanku a vzorku; průtok: 0,5 ml/min;
UV detekce; t_R (Kyn) = 2,7 min; t_R (KynAc) = 6,5 min



Obr. 14 Shora dolů chromatogram standardů, blanku a vzorku; průtok: 0,5 ml/min;
fluorescenční detekce; t_R (Trp) = 4,7 min; t_R (5-HT) = 5,8 min;
 t_R (5-OHI3Ac) = 7,8 min

Závěr: Metoda je pro dané látky selektivní. Při analýze tryptofanu, serotoninu a kyseliny 5-hydroxyindol-3-octové docházelo i při nízkých koncentracích k separaci až na základní linii. Problém by mohl nastat v případě hodnocení nízkých koncentrací kynureninu a

kyseliny kynurenové, kdy by mohlo docházet k interferencím s píky blanku, které mají blízké retenční časy. I přes tento fakt bylo možné při pečlivém vyhodnocení dané látky kvantifikovat s přijatelnou odchylkou i při velmi nízkých koncentracích (kapitola 5.5.4), a proto může být metoda považována za selektivní.

5.5.2 Citlivost

Roztoky byly nastříkovány v objemech 1 μ l, 20 μ l a 100 μ l. Z výsledných chromatogramů byl odečten poměr signálu k šumu a z těchto hodnot byl následně vypočítán limit kvantifikace při nastříknutém objemu 20 μ l, který se pro potřeby analýzy jevil jako optimální.

Tab. 13 S/N při objemu nástřiku 20 μ l

Analyt	Kyn	Trp	5-HT	KynAc	5-OHI3Ac
S/N	2,31	117,16	13,86	1,43	17,83

Tab. 14 LOQ při objemu nástřiku 20 μ l

Analyt	Kyn	Trp	5-HT	KynAc	5-OHI3Ac
LOQ	6,34	0,20	1,47	13,40	2,89

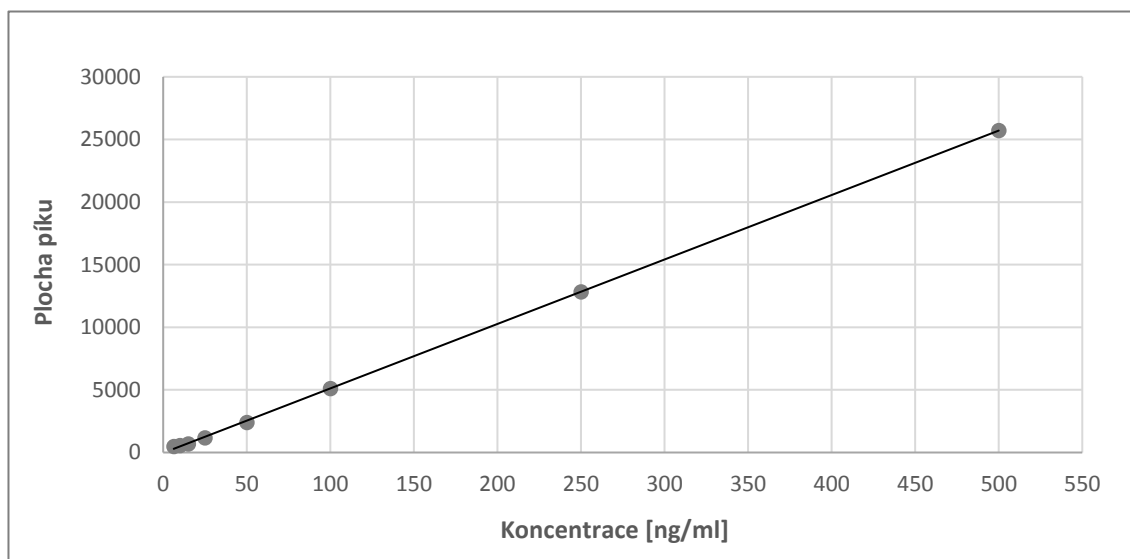
Závěr: Byly stanoveny limity kvantifikace pro jednotlivé látky. Při pozdější validaci správnosti a přesnosti se však ukázalo, že kvantitativní vyhodnocení kynureninu, tryptofanu a serotoninu není při těchto koncentracích možné. Pro validaci dalších parametrů byl u těchto tří látek jako limit kvantifikace použit vždy druhý bod kalibrační křivky. Pro kynurenin se jedná o koncentraci 15 ng/ml, pro tryptofan a serotonin 5 ng/ml.

5.5.3 Linearita

Pro stanovení linearity byla použita metoda kalibrační křivky. Pro každou látku bylo hodnoceno minimálně pět roztoků různých koncentrací. Jako nejnižší koncentrace sloužil pro jednotlivé analyty jejich limit kvantifikace zjištěný při hodnocení citlivosti.

Tab. 15 Hodnoty kalibrační přímky pro kynurenin

Koncentrace [ng/ml]	Plocha píku
6,3	474
10	559
15	695
25	1176
50	2404
100	5106
250	12831
500	25726



Obr. 15 Graf závislosti plochy píku kynureninu na jeho koncentraci

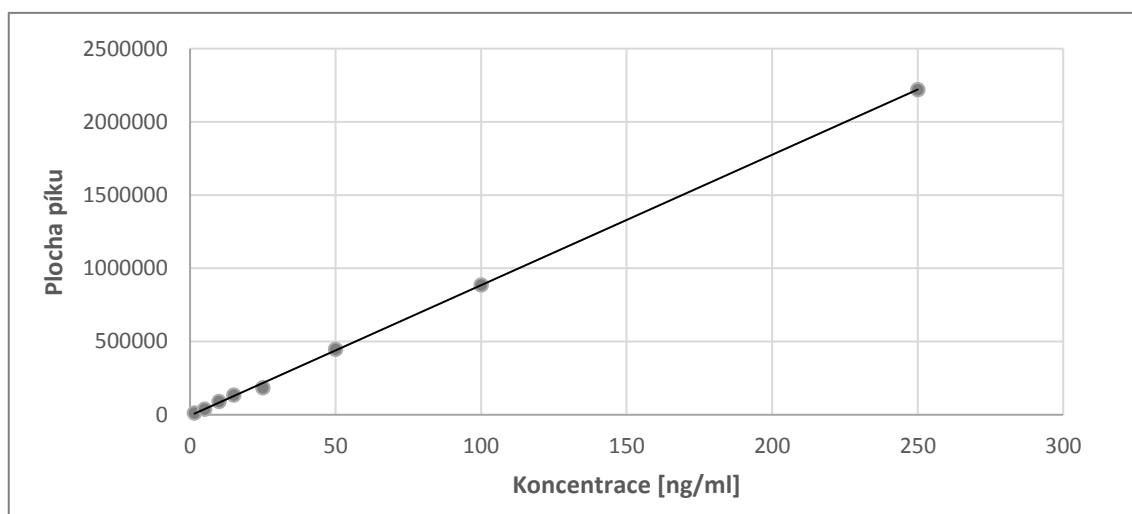
Regresní rovnice: $y = 51,475x - 31,851$

Koeficient determinace: $R^2 = 0,9999$

Koeficient korelace: $R = 0,9999$

Tab. 16 Hodnoty kalibrační přímky pro tryptofan

Koncentrace [ng/ml]	Plocha píku
1,5	12261
5	39045
10	90916
15	134806
25	185384
50	448062
100	887236
250	2220538



Obr. 16 Graf závislosti plochy píku tryptofanu na jeho koncentraci

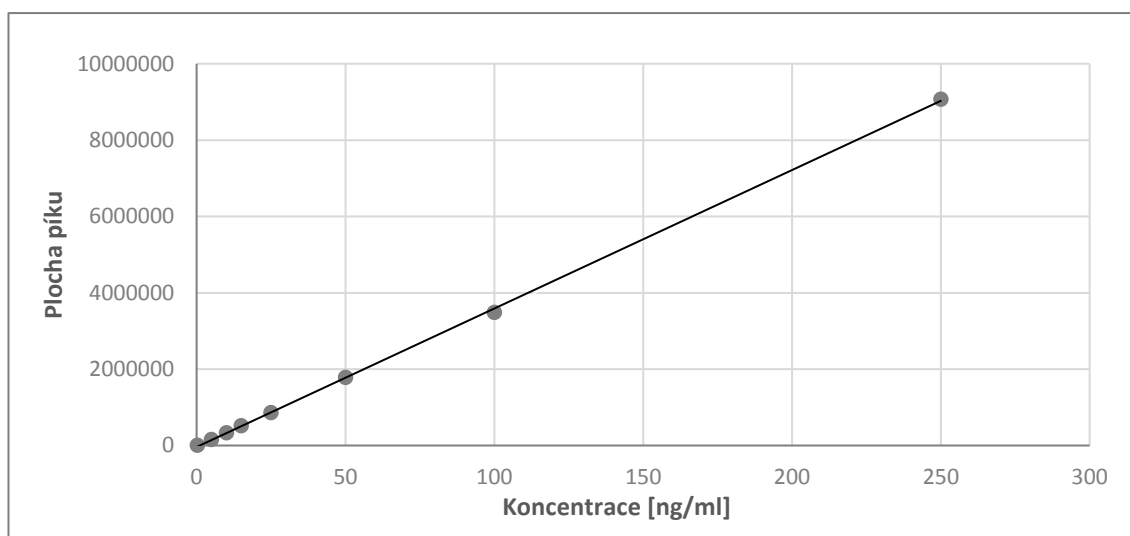
Regresní rovnice: $y = 8907,8x - 6019$

Koeficient determinace: $R^2 = 0,9997$

Koeficient korelace: $R = 0,9998$

Tab. 17 Hodnoty kalibrační přímky pro serotonin

Koncentrace [ng/ml]	Plocha píku
0,2	5894
5	156460
10	332055
15	515452
25	856559
50	1782628
100	3481373
250	9068623



Obr. 17 Graf závislosti plochy píku serotoninu na jeho koncentraci

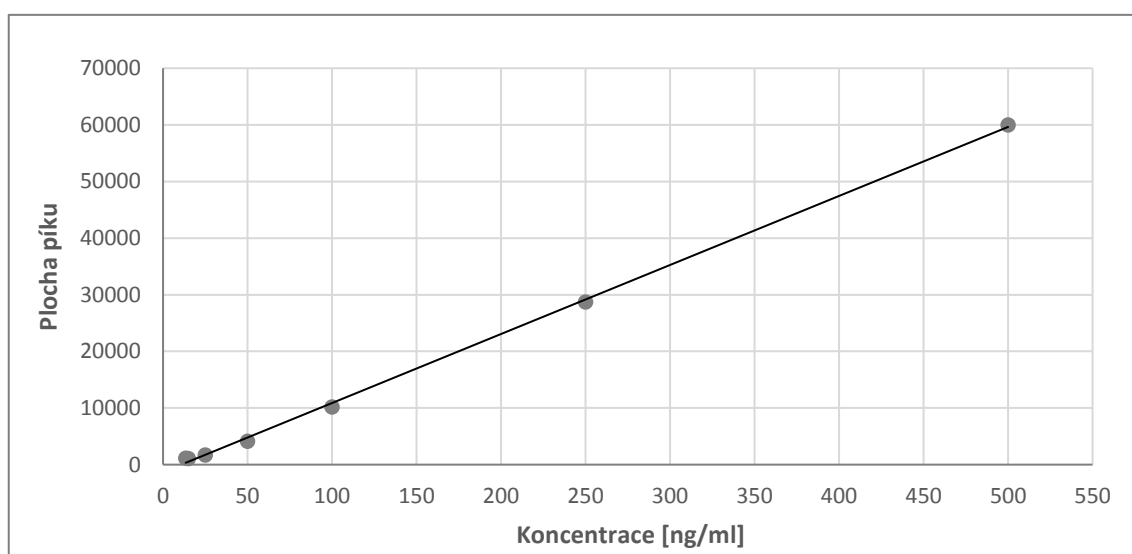
Regresní rovnice: $y = 36265x - 38608$

Koeficient determinace: $R^2 = 0,9998$

Koeficient korelace: $R = 0,9999$

Tab. 18 Hodnoty kalibrační přímky pro kyselinu kynurenovou

Koncentrace [ng/ml]	Plocha píku
13,4	1158
15	1059
25	1734
50	4129
100	10211
250	28725
500	60008



Obr. 18 Graf závislosti plochy píku kyseliny kynurenové na její koncentraci

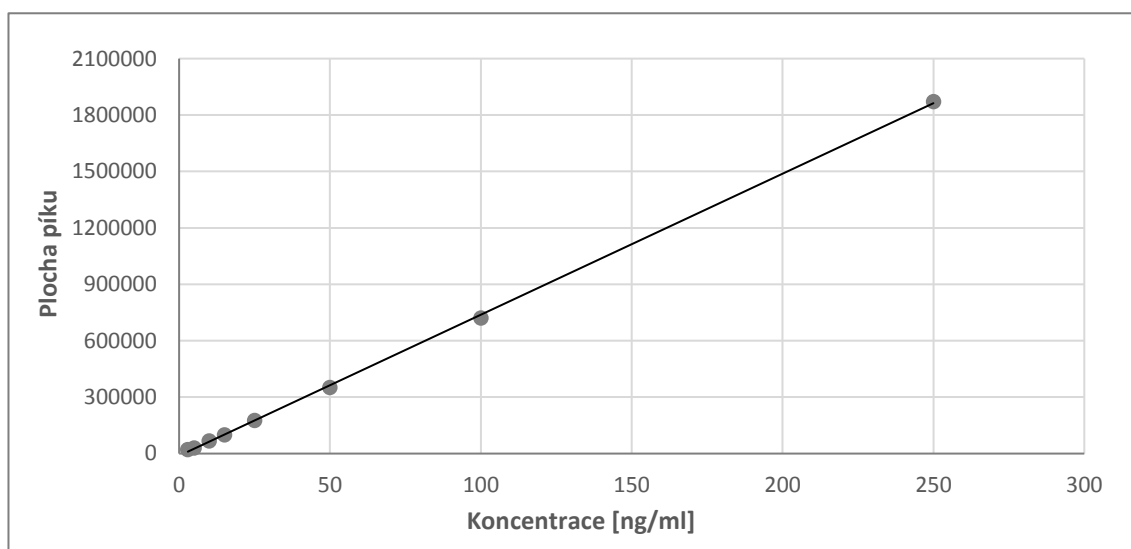
Regresní rovnice: $y = 121,88x - 1311,5$

Koeficient determinace: $R^2 = 0,9992$

Koeficient korelace: $R = 0,9996$

Tab. 19 Hodnoty kalibrační přímky pro kyselinu 5-hydroxyindol-3-octovou

Koncentrace [ng/ml]	Plocha píku
2,9	21890
5	29950
10	67532
15	99929
25	176700
50	351446
100	721710
250	1871496



Obr. 19 Graf závislosti plochy píku kyseliny 5-hydroxyindol-3-octové na její koncentraci

Regresní rovnice: $7498,1x - 11589$

Koeficient determinace: $R^2 = 0,9998$

Koeficient korelace: $R = 0,9999$

Závěr: Bylo prokázáno, že daná metoda je lineární. Hodnoty korelačních koeficientů jsou pro všechny látky vyšší než 0,999.

5.5.4 Správnost a přesnost

Jako plochy píků vnějších standardů (ES) byly pro výpočty použity hodnoty získané při hodnocení linearit (kapitola 5.5.3). Pro kynurenin a kyselinu kynurenovou to byly plochy píků o koncentraci 100 ng/ml, pro tryptofan, serotonin a kyselinu 5-hydroxyindol-3-octovou plochy píků o koncentraci 50 ng/ml.

Tab. 20 Stanovení správnosti a přesnosti pro kynurenin

Koncentrace [ng/ml]	Plocha píku Kyn	Poměr ploch Kyn/ES	Vypočítaná koncentrace [ng/ml]	Odchylka [%]	RSD [%]
15	850	0,17	16,65	11,11	4,14
	871	0,17	17,06		
	899	0,18	17,61		
	815	0,16	15,96		
	820	0,16	16,06		
250	13902	2,72	272,27	8,26	0,68
	13834	2,71	270,94		
	13904	2,72	272,31		
	13680	2,68	267,92		
	13778	2,70	269,84		
500	28033	5,49	549,02	10,45	0,51
	28070	5,50	549,75		
	28343	5,55	555,09		
	28335	5,55	554,94		
	28207	5,52	552,43		

Tab. 21 Stanovení správnosti a přesnosti pro tryptofan

Koncentrace [ng/ml]	Plocha píku Trp	Poměr ploch Trp/ES	Vypočítaná koncentrace [ng/ml]	Odchylka [%]	RSD [%]
5	39441	0,09	4,40	-10,98	1,87
	41186	0,09	4,60		
	39591	0,09	4,42		
	39398	0,09	4,40		
	39813	0,09	4,44		
50	430091	0,96	47,99	-3,66	0,86
	433818	0,97	48,41		
	435358	0,97	48,58		
	433070	0,97	48,33		
	425964	0,95	47,53		
250	2276786	5,08	254,07	1,18	0,52
	2260435	5,04	252,25		
	2280696	5,09	254,51		
	2252137	5,03	251,32		
	2263401	5,05	252,58		

Tab. 22 Stanovení správnosti a přesnosti pro serotonin

Koncentrace [ng/ml]	Plocha píku 5-HT	Poměr ploch 5-HT/ES	Vypočítaná koncentrace [ng/ml]	Odchylka [%]	RSD [%]
5	173040	0,10	4,85	-2,20	1,99
	173906	0,10	4,88		
	170230	0,10	4,77		
	174775	0,10	4,90		
	179738	0,10	5,04		
50	1777551	1,00	49,86	-0,87	0,71
	1749246	0,98	49,06		
	1775454	1,00	49,80		
	1774711	1,00	49,78		
	1758815	0,99	49,33		
250	8891024	4,99	249,38	-0,68	0,40
	8838333	4,96	247,90		
	8867276	4,97	248,71		
	8866273	4,97	248,69		
	8797888	4,94	246,77		

Tab. 23 Stanovení správnosti a přesnosti pro kyselinu kynurenovou

Koncentrace [ng/ml]	Plocha píku KynAc	Poměr ploch KynAc/ES	Vypočítaná koncentrace [ng/ml]	Odchylka [%]	RSD [%]
13,4	1333	0,13	13,05	7,20	9,00
	1569	0,15	15,37		
	1466	0,14	14,36		
	1626	0,16	15,92		
	1340	0,13	13,12		
250	27313	2,67	267,49	6,20	1,23
	27313	2,67	267,49		
	26556	2,60	260,07		
	27035	2,65	264,76		
	27328	2,68	267,63		
500	53420	5,23	523,16	5,55	1,18
	53028	5,19	519,32		
	54533	5,34	534,06		
	54234	5,31	531,13		
	54234	5,31	531,13		

Tab. 24 Stanovení správnosti a přesnosti pro kyselinu 5-hydroxy-3-indolactovou

Koncentrace [ng/ml]	Plocha píku 5-OHI3Ac	Poměr ploch 5-OHI3Ac/ES	Vypočítaná koncentrace [ng/ml]	Odchylka [%]	RSD [%]
2,9	18797	0,05	2,67	-9,84	4,20
	18473	0,05	2,63		
	17101	0,05	2,43		
	18388	0,05	2,62		
	19134	0,05	2,72		
50	357675	1,02	50,89	2,26	1,35
	358059	1,02	50,94		
	352835	1,00	50,20		
	364684	1,04	51,88		
	363603	1,03	51,73		
250	1743543	4,96	248,05	-0,41	0,26
	1754520	4,99	249,61		
	1747504	4,97	248,62		
	1753547	4,99	249,48		
	1750976	4,98	249,11		

Závěr: Získané odchylky vyhovují hodnotám pro stanovení správnosti. Relativní směrodatné odchylky analyzovaných vzorků vyhovují limitům pro stanovení přesnosti.

5.5.5 Opakovatelnost

Tab. 25 Stanovení opakovatelnosti pro kynurenin

Koncentrace Kyn [ng/ml]	Plocha píku Kyn					RSD [%]
15	819	816	810	819	862	2,53
250	13274	13421	13443	13386	13693	1,15
500	28108	28159	28069	28121	28097	0,12

Tab. 26 Stanovení opakovatelnosti pro tryptofan

Koncentrace Trp [ng/ml]	Plocha píku Trp					RSD [%]
5	40928	40130	40965	40681	40609	0,82
50	412287	427045	429946	421233	429968	1,17
250	2230743	2222243	2241206	22223574	2259503	0,69

Tab. 27 Stanovení opakovatelnosti pro serotonin

Koncentrace 5-HT [ng/ml]	Plocha píku 5-HT					RSD [%]
5	171738	173478	170450	169409	169031	1,06
50	1714508	1715993	1719551	1725947	1704664	0,45
250	8979713	8967023	8935373	8928717	8961200	0,24

Tab. 28 Stanovení opakovatelnosti pro kyselinu kynurenovou

Koncentrace KynAc [ng/ml]	Plocha píku KynAc					RSD [%]
13,4	1339	1350	1439	1382	1248	5,16
250	27307	28109	27824	26942	27194	1,74
500	54643	54001	54441	53681	54501	0,74

Tab. 29 Stanovení opakovatelnosti pro kyselinu 5-hydroxyindol-3-octovou

Koncentrace 5-OHI3Ac [ng/ml]	Plocha píku 5-OHI3Ac					RSD [%]
2,9	18340	19092	17898	18454	18824	2,48
50	332365	340727	337681	342987	337874	1,18
250	1752791	1756717	1732048	1713207	1752338	1,06

Závěr: Naměřené relativní směrodatné odchylky odpovídají hodnotám pro validaci opakovatelnosti.

5.5.6 Stabilita

Stabilita vzorků byla sledována v autosampleru při teplotě 8 °C. Analýza byla prováděna v časech t_0 , $t_1 = 20$ h a $t_2 = 44$ h.

Tab. 30 Stanovení stability pro kynurenin

Koncentrace [ng/ml]	Plocha píku			Odchylka t_1 [%]	Odchylka t_2 [%]
	t_0	t_1	t_2		
15	819	816	840	-0,37	2,56
	816	828	782	1,47	-4,17
	857	850	846	0,82	-1,28
250	13274	13273	13552	-0,01	2,09
	13421	13406	13721	-0,11	2,24
	13171	13024	13144	-1,12	-0,20
500	28108	27706	27551	-1,43	-1,98
	28159	26991	27788	-4,15	-1,32
	28839	28433	28309	-1,41	-1,84

Tab. 31 Stanovení stability pro tryptofan

Koncentrace [ng/ml]	Plocha píku			Odchylka t_1 [%]	Odchylka t_2 [%]
	t_0	t_1	t_2		
5	40928	42427	42398	3,66	3,59
	40130	40055	43002	-0,19	7,16
	41528	43375	43961	4,45	5,86
50	412287	417021	410999	1,15	-0,31
	427045	429340	417273	0,54	-2,29
	406904	404080	379460	-0,69	-6,74
250	2230743	2301433	2238937	3,17	0,37
	2222243	2245085	2245795	1,03	1,06
	2174897	2083243	1924475	-4,21	-11,51

Tab. 32 Stanovení stability pro serotonin

Koncentrace [ng/ml]	Plocha píku			Odchylka t ₁ [%]	Odchylka t ₂ [%]
	t ₀	t ₁	t ₂		
5	171738	166614	164487	-2,98	-4,22
	173478	175111	162879	0,94	-6,11
	174853	167149	167367	-4,41	-4,28
50	1714508	1658413	1604417	-3,27	-6,42
	1715993	1720267	1622979	0,25	-5,42
	1691463	1645403	1647382	-2,72	-2,61
250	8979713	8920132	8812160	-0,66	-1,87
	8967023	8928305	8630254	0,43	-3,76
	8791024	8613418	8580005	-2,02	-2,40

Tab. 33 Stanovení stability pro kyselinu kynurenovou

Koncentrace [ng/ml]	Plocha píku			Odchylka t ₁ [%]	Odchylka t ₂ [%]
	t ₀	t ₁	t ₂		
13,4	1339	1361	1198	1,64	-10,53
	1350	1329	1691	-1,56	25,26
	1350	1363	1197	0,96	-11,33
250	27307	27649	53816	1,25	-1,07
	28109	28497	52888	1,38	1,96
	28905	29873	51741	3,35	1,64
500	54643	27015	52963	-1,51	-3,07
	54001	28660	51277	-2,06	-5,04
	53830	29379	51392	-3,88	-4,53

Tab. 34 Stanovení stability pro kyselinu 5-hydroxy-3-indoloctovou

Koncentrace [ng/ml]	Plocha píku			Odchylka t ₁ [%]	Odchylka t ₂ [%]
	t ₀	t ₁	t ₂		
2,9	18340	18283	19664	-0,31	7,22
	19092	17339	19523	-9,18	2,26
	18547	18840	17604	1,58	-5,08
50	332365	325367	310593	-2,11	-6,55
	340727	313407	331610	-8,02	-2,68
	357340	323461	335811	-9,48	-6,02
250	1752791	1763087	1816822	0,59	3,65
	1756717	1793113	1809727	2,07	3,02
	1797576	1802435	1744987	0,27	-2,93

Závěr: Vzorke jsou při teplotě 8 °C stabilní i po 44 hodinách (odchylka $t_2 < |15| \%$). Výjimkou je kyselina kynurenová v koncentraci 13,4 ng/ml (LOQ), pro kterou byla stabilita prokázána pouze po 20 hodinách. Důvodem je nestabilita Krebsova živného roztoku, ve kterém se v čase eluce kyseliny kynurenové začíná po 44 hodinách tvořit pík, a je tak znemožněna kvantifikace analytu.

5.6 Shrnutí výsledků validace

Tab. 35 Validační parametry pro kynurenin

Selektivita	prokázána
Linearita	$y = 51,475x - 31,851$ $R = 0,9999$
Správnost	v rozmezí 108,26 % – 111,11 %
Přesnost	RSD = 1,78 %
Opakovatelnost	RSD = 1,27 %
Stabilita	$t_1 = 95,85 \% - 101,47 \%$
	$t_2 = 95,83 \% - 102,56 \%$

Tab. 36 Validační parametry pro tryptofan

Selektivita	prokázána
Linearita	$y = 8907,8x - 6019$ $R = 0,9998$
Správnost	v rozmezí 89,02 % – 101,18 %
Přesnost	RSD = 1,08 %
Opakovatelnost	RSD = 1,09 %
Stabilita	$t_1 = 95,79 \% - 104,45 \%$
	$t_2 = 88,49 \% - 107,16 \%$

Tab. 37 Validační parametry pro serotonin

Selektivita	prokázána
Linearita	$y = 36265x - 38608$ $R = 0,9999$
Správnost	v rozmezí 97,80 % – 99,32 %
Přesnost	RSD = 1,03 %
Opakovatelnost	RSD = 0,59 %
Stabilita	$t_1 = 95,59 \% - 100,94 \%$
	$t_2 = 93,58 \% - 98,13 \%$

Tab. 38 Validační parametry pro kyselinu kynurenovou

Selektivita	prokázána
Linearita	$y = 121,88x - 1311,5$ $R = 0,9996$
Správnost	v rozmezí 105,55 % – 107,20 %
Přesnost	RSD = 3,80 %
Opakovatelnost	RSD = 2,55 %
Stabilita	$t_1 = 96,12 \% - 103,35 \%$
	$t_2 = 88,67 \% - 125,26 \%$

Tab. 39 Validační parametry pro kyselinu 5-hydroxy-3-indoloctovou

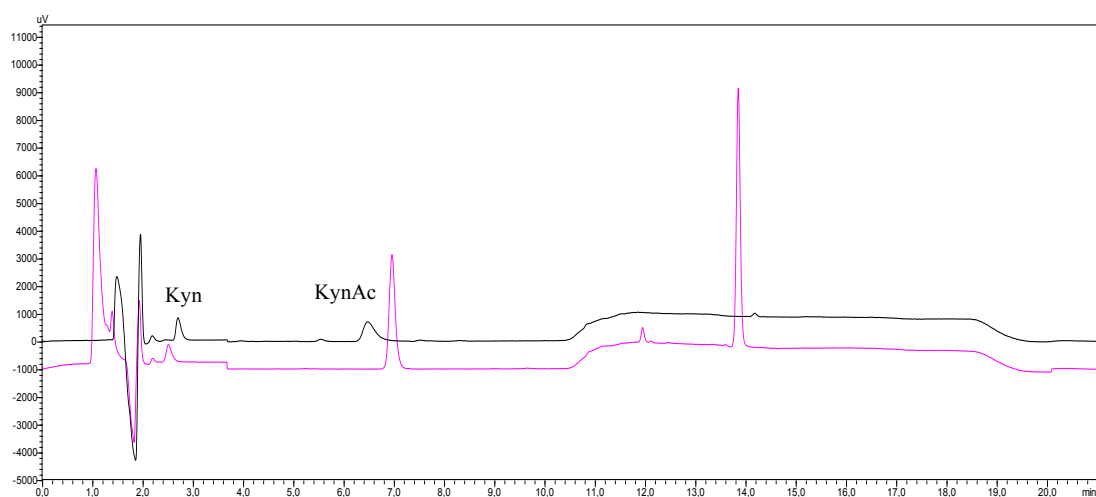
Selektivita	prokázána
Linearita	$y = 7498,1x - 11589$ $R = 0,9999$
Správnost	v rozmezí 90,16 % – 102,26 %
Přesnost	RSD = 1,94 %
Opakovatelnost	RSD = 1,57 %
Stabilita	$t_1 = 90,52 \% - 101,58 \%$
	$t_2 = 93,45 \% - 107,22 \%$

5.7 Hodnocení melatoninu

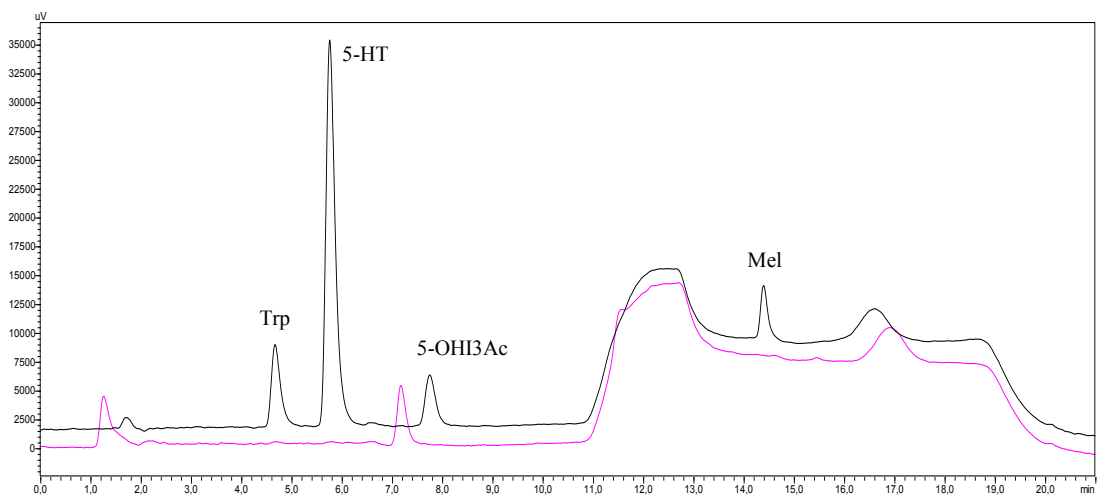
V případě, že by měl být hodnocen i melatonin, byla vyvinuta metoda s gradientovou elucí. Melatonin byl detekován pomocí fluorescenčního detektoru; Ex/Em: 307/395 nm; t_R (Mel) = 14,3 min. Celková doba analýzy byla 21 minut. Ostatní parametry metody zůstaly zachovány.

Tab. 40 Gradient vyvinuté metody

Čas [min]	MF A [%]	MF B [%]
0,00 - 7,00	100	0
7,00 - 8,00	100 → 82	0 → 20
8,00 - 16,00	80	20
16,00 - 17,00	80 → 100	20 → 0
17,00 - 21,00	100	0



Obr. 20 Shora dolů chromatogram standardu a blanku; průtok 0,5 ml/min; UV detekce; t_R (Kyn) = 2,7 min; t_R (KynAc) = 6,5 min



Obr. 21 Shora dolů chromatogram standardu a blanku; průtok 0,5 ml/min;

fluorescenční detekce; t_R (Trp) = 4,7 min; t_R (5-HT) = 5,8 min;

t_R (5-OHI3Ac) = 7,8 min; t_R (Mel) = 14,3 min

6 ZÁVĚR

V této diplomové práci byla vyvinuta HPLC metoda pro hodnocení tryptofanu a jeho metabolitů (serotoninu, kynureninu, kyseliny kynurenové a kyseliny 5-hydroxyindol-3-octové). Proběhla optimalizace chromatografických podmínek a bylo ověřeno, že parametry dané metody splňují požadavky na zamýšlené analytické použití.

V teoretické části byly uvedeny poznatky o analyzovaných látkách, jejich metabolismu, vlastnostech a významu jejich dalšího zkoumání. Dále byly v teoretické části shrnuty informace o vysokoúčinné kapalinové chromatografii. V experimentální části byly popsány základní postupy přípravy mobilní fáze a roztoků pro validaci metody a byl zde uveden průběh optimalizace chromatografických podmínek.

Parametry vyvinuté metody jsou uvedeny v kapitole 5.4.

V experimentální části byly mimo jiné prozkoumány možnosti pro stanovení kyseliny chinolinové, u níž se ukázalo, že vykazuje minimální retenci při jakýchkoli zkoušených podmínkách. Došlo se navíc k závěru, že její spektrofotometrická detekce je velmi málo citlivá. Pro hodnocení melatoninu musela být vyvinuta metoda s gradientovou elucí z důvodu jeho vyšší lipofility v porovnání s ostatními analyzovanými látkami.

Metoda vyvinutá pro stanovení tryptofanu, kynureninu, kyseliny kynurenové, serotoninu a kyseliny 5-hydroxyindol-3-octové byla validována dle oficiálních směrnic. Validační parametry zahrnovaly selektivitu, citlivost, linearitu, správnost, přesnost, opakovatelnost a stabilitu. Sledované parametry vyhovovaly požadavkům stanoveným oficiálními směrnici.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

5-HT	Serotonin (5-hydroxytryptamin)
5-OHI3Ac	Kyselina 5-hydroxyindol-3-octová
ACN	Acetonitril
Em	Emise (<i>Emission</i>)
EMA	Evropská léková agentura (<i>European Medicines Agency</i>)
ES	Vnější standard (<i>External standard</i>)
Ex	Excitace (<i>Excitation</i>)
FaF UK v HK	Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (<i>Food and Drug Administration</i>)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie (<i>Hydrophilic Interaction Chromatography</i>)
ICH	Směrnice Mezinárodní konference pro harmonizaci (<i>The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>)
ID	Vnitřní průměr (<i>Internal diameter</i>)
IDO	Indolamin 2,3-dioxygenasa
IEC	Iontově výměnná chromatografie (<i>Ion Exchange Chromatography</i>)
IgE	Imunoglobulin E
IS	Vnitřní standard (<i>Internal standard</i>)

KMO	Kynurenin monooxygenasa
Kyn	Kynurenin
KynAc	Kyselina kynurenová
LLOQ	Spodní limit kvantifikace (<i>Lower limit of quantification</i>)
LOQ	Limit kvantifikace (<i>Limit of quantification</i>)
Mel	Melatonin
MeOH	Methanol
MF	Mobilní fáze
MS	Hmotnostní spektrometrie (<i>Mass spectrometry</i>)
NAD ⁺	Nikotinamidadeninukleotid
NADP ⁺	Nikotinamidadeninukleotid fosfát
NMDA	<i>N</i> -metyl-D-aspartát
NMR	Nukleární magnetická rezonance (<i>Nuclear magnetic resonance</i>)
NP-LC	Chromatografie na normální fázi (<i>Normal-phase liquid chromatography</i>)
Obr.	Obrázek
PDA	Detektor diodového pole (<i>Photodiode-array detector</i>)
PEG	Polyethylenglykol
PFP	Pentafluorofenylpropyl
RP-LC	Chromatografie na reverzní fázi (<i>Reversed-phase liquid chromatography</i>)
RSD	Relativní směrodatná odchylka

SEC	Molekulová vylučovací chromatografie (<i>Size exclusion chromatography</i>)
SF	Stacionární fáze
Tab.	Tabulka
TDO	Tryptofan 2,3-dioxygenasa
t _R	Retenční čas
Trp	Tryptofan
UV	Ultrafialový (<i>Ultraviolet</i>)
VIS	Oblast viditelného spektra (<i>Visible spectrum</i>)
Ž.r.	Živný roztok

8 POUŽITÁ LITERATURA

1. *Český lékopis*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, **2017**. ISBN 978-80-271-0500-7
2. Cetina Biefer, H. R., et al. Aspects of tryptophan and nicotinamide adenine dinucleotide in immunity: A new twist in an old tale. *International Journal of Tryptophan Research*. **2017**, 10(1).
3. Badawy, A. A. B. Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: Regulatory and functional aspects. *International Journal of Tryptophan Research*. **2017**, 10(1).
4. Palego, L., et al. Tryptophan biochemistry: Structural, nutritional, metabolic, and medical aspects in humans. *Journal of Amino Acids*. **2016**, 2016.
5. Richard, D. M., et al. L-tryptophan: Basic metabolic functions, behavioral research and therapeutic indications. *International Journal of Tryptophan Research*. **2009**, 2(1), 45–60.
6. Lovelace, M. D., et al. Recent evidence for an expanded role of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in neurological diseases. *Neuropharmacology*. **2017**, 112, 373–388.
7. Holeček, M. *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., **2006**. ISBN 80-247-1562-7
8. Phillips, R. S., et al. Modulation of enzyme activity in the kynurenine pathway by kynurenine monooxygenase inhibition. *Frontiers in Molecular Biosciences*. **2019**, 6, 1–9.
9. Du, T., et al. Simultaneous determination of tryptophan, kynurenine, kynurenic acid and two monoamines in rat plasma by HPLC-ECD/DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2018**, 158, 8–14.
10. Badawy, A. A.-B. Tryptophan Metabolism: A Versatile Area Providing Multiple Targets for Pharmacological Intervention. *Egyptian Journal of Basic and Clinical Pharmacology*. **2019**, 9.
11. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1066> [staženo 16. 1. 2020].
12. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5202> [staženo 16. 1. 2020].
13. El-Merahbi, R., et al. The roles of peripheral serotonin in metabolic homeostasis. *FEBS Letters*. **2015**, 589(15), 1728–1734.
14. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/896> [staženo 16. 1. 2020].
15. Tordjman, S., et al. Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. *Current Neuropharmacology*. **2017**, 15, 434–443.

16. Meng, X., et al. Dietary sources and bioactivities of melatonin. *Nutrients*. **2017**, 9(4), 1–64.
17. Hardeland, R. Neurobiology, pathophysiology, and treatment of melatonin deficiency and dysfunction. *The Scientific World Journal*. **2012**, 2012.
18. Huang, Y., et al. Tranilast directly targets NLRP 3 to treat inflammasome-driven diseases. *EMBO Molecular Medicine*. **2018**, 10(4), 1–15.
19. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6305> [staženo 16. 1. 2020].
20. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3845> [staženo 16. 1. 2020].
21. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1826> [staženo 16. 1. 2020].
22. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/846> [staženo 16. 1. 2020].
23. Klimeš, J. et al. *Kontrolně-analytické hodocení léčiv lékopisnými metodami*. 2. vyd. Hradec Králové: Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, **2015**. ISBN 978-80-260-8175-3
24. Nováková, L., et al. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1. vyd. Praha: Lucie Nováková, **2013**. ISBN 978-80-260-4243-3
25. https://www.waters.com/waters/en_GB/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_GB [staženo 26. 10. 2019].
26. Snyder, L. R., et al. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 3. vyd. Hoboken, New Jersey: Wiley, **2010**. ISBN 978-0-470-16754-0
27. Teutenberg, T., et al. Temperature and pH-stability of commercial stationary phases. *Journal of Separation Science*. **2009**, 32(9), 1262–1274.
28. Buszewski, B., et al. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2012**, 402(1), 231–247.
29. Yabré, M., et al. Greening reversed-phase liquid chromatography methods using alternative solvents for pharmaceutical analysis. *Molecules*. **2018**, 23(5).
30. Gumustas, M., et al. The History of the Core–Shell Particles and Applications in Active Pharmaceutical Ingredients Via Liquid Chromatography. *Chromatographia*. **2019**, 82(1), 17–48.
31. <https://www.chromservis.eu/i/core-shell-technology?lang=CZ> [staženo 14. 12. 2019].
32. <https://www.labicom.cz/produkty/spotrebni-material/kapalinova-chromatogr-prislusenstvi/hplcuhplc-kolony-predkolony-filtry/supelco> [staženo 14. 12. 2019].

33. <https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=104698603> [staženo 14. 12. 2019].
34. Rediscover Method Development [online], [cit. 2019-12-14]. Dostupné z: <https://www.labicom.cz/cogwpspod/uploads/2016/07/Supelco-LC_Discovery_catalog.pdf>
35. Swartz, M. HPLC detectors: A brief review. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. **2010**, 33(9–12), 1130–1150.
36. <https://labguide.cz/fluorochromy/> [staženo 21. 1. 2019].
37. Nováková, L., et al. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. 1. vyd. Praha: Lucie Nováková, **2013**. ISBN 978-80-260-4244-0
38. Sabir, A. M., et al. Hplc Method Development and Validation: a Review. *International Research Journal of Pharmacy*. **2016**, 4(4), 39–46.
39. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Humans. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)* [online]. [cit. 2019-12-07]. Dostupné z: <https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf>
40. Guidance for Industry. *Bioanalytical Method Validation* [online]. [cit. 2019-12-07]. Dostupné z: <<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>>
41. European medicines agency. *Guideline on bioanalytical method validation* [online]. [cit. 2019-12-07]. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf>
42. Málková, K. HPLC hodnocení L - tryptofanu a jeho metabolitů v biologickém materiálu. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Hradec Králové: Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, **2019**.
43. https://www.researchgate.net/post/Sensitive_and_selective_method_for_HPLC_analysis_of_quinolinic_acid_from_biological_materials [staženo 23. 11. 2019].
44. *Differences Between Using Acetonitrile and Methanol for Reverse Phase Chromatography* [online]. [cit. 2019-11-23]. Dostupné z: <<https://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/lctalk/35/35lab.html>>
45. Pattison, M. The Role of Methanol and Acetonitrile as Organic Modifiers in Reversed-phase Liquid Chromatography. *Chromatography Today*. **2019**, (2), 24–26.