

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



**STUDIE RETENČNÍCH VLASTNOSTÍ VYBRANÝCH METABOLITŮ
TYROSINU V PODMÍNKÁCH HPLC**

Diplomová práce

Michaela Gieslerová

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

Hradec Králové, 2022

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

V Hradci Králové dne 8.5. 2022

Michaela Gieslerová

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli PharmDr. Petru Kastnerovi, Ph.D. a Ing. Danielovi Heblíkovi za odborné vedení, poskytnutí cenných rad, času a trpělivosti při vypracování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat i ostatním pracovníkům katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy za podporu a vytváření příjemného pracovního prostředí.

Tato diplomová práce vznikla v letech 2021 a 2022 za podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy (GA UK č. 349 521) a SVV 260 547.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: Michaela Gieslerová

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

Název diplomové práce: Studie retenčních vlastností vybraných metabolitů tyrosinu v podmínkách HPLC

Tématem diplomová práce bylo studium retenčních vlastností vybraných metabolitů tyrosinu v podmínkách vysokoúčinné kapalinové chromatografie s použitím spektrofotometrické (285 nm) a fluorimetrické detekce (emisní 279, excitační 320). Celkem bylo zkoumáno 8 analytů – tyrosin, L-DOPA, dopamin, adrenalin, noradrenalin, kyselina homovanilová a vanilmandlová.

Nejprve byl zkoumán vliv složení mobilní fáze, koncentrace pufru a pH na separaci daných analytů. Analýza proběhla na referenční koloně KINETEX 5 μm EVO C18 (150 mm x 3 mm, 5 μm ; PHENOMENEX). Jako nejlépe hodnocená mobilní fáze byla methanol:100 mM kyselina octové (pH bylo upraveno hydroxidem sodným na 4,5); 5:95.

Poté byl studován vliv složení stacionární fáze na separaci s použitím mobilní fáze, která je popsána dříve. Celkem bylo studováno 7 různých kolon, a to SF s modifikovaným silikagel C₁₈ skupinou, PFP skupinou, dále kombinované SF (C₁₈ skupina s aromatickým jádrem, kombinace C₁₈ skupina s PFP) a na závěr dvě kolony se skupinou C₁₈ a dále nespecifikovanými polárními skupinami. Nejlepší separace bylo dosaženo s kolonou ARION C18 polar (kolona s C₁₈ skupinou a dále nespecifikovanými polárními skupinami), celková doba analýzy byla 15 minut. Všechny experimenty byly provedeny izokratickou elucí. Průtoková rychlost byla 0,3 ml/min. Teplota na koloně 25 °C. Objem nástřiku byl nástřiku 5 μl .

Klíčová slova: HPLC, tyrosin, katecholaminy

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Michaela Gieslerová

Supervisor: PharmDr. Petr Kastner, Ph.D.

Title of thesis: Study of retention properties of selected tyrosine metabolites under HPLC conditions

The aim of this diploma thesis was to study the retention properties of selected tyrosine metabolites under the high performance liquid chromatography using spectrophotometric (285 nm) and fluorimetric detection (emission 279 nm, excitation 320 nm). The total of eight analytes was examined – tyrosine, L-DOPA, dopamine, epinephrine, norepinephrine, homovanillic and vanillylmandelic acid.

Firstly, we studied the effect of mobile phase composition, buffer concentration and pH for the separation of analytes. Analysis of selected analytes was performed using an KINETEX 5 μm EVO C18 column (150 mm x 3 mm, 5 μm ; PHENOMENEX). The best separation showed the mobile phase methanol:100 mM acetic acid (pH adjusted with sodium hydroxide to 4,5); 5:95.

Next, the effect of stationary phase for the separation of analytes was studied with the mobile phase described above. A total of 7 different columns were studied, namely stationary phases with modified silica gel C₁₈ group, PFP group, combined stationary phase (C₁₈ group with aromatic functionality, combination C₁₈ group with PFP) and two columns with C₁₈ group with unspecified polar groups. The best separation was achieved with an ARION C18 polar column (column with C₁₈ group with unspecified polar groups), total runtime was 15 min. All experiments were performed by isocratic elution. The flow rate was 0,3 ml/min. The column temperature was set at 25 °C. The injection volume was 5 μl .

Keywords: HPLC, tyrosine, catecholamines

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. CÍL	9
3. TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1. TYROSIN A JEHO METABOLITY	10
3.1.1. Tyrosin	10
3.1.2. Levodopa	10
3.1.3. Katecholaminy	11
3.2. METABOLISMUS TYROSINU	14
3.3. VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE	16
3.3.1. Obecná charakteristika a princip kapalinové chromatografie	16
3.3.2. Obecná schéma kapalinového chromatografu	16
3.3.3. Stacionární fáze	19
3.3.4. Separační módy	21
3.3.5. Detektory	23
3.3.6. Validace	27
3.3.7. Základní chromatografické charakteristiky	27
3.3.8. Příprava vzorku	28
3.4. STUDIE PRO STANOVENÍ TYROSINU A JEHO METABOLITŮ ...	30
4. METODICKÁ ČÁST	35
4.1. CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE, POMŮCKY	35
4.2. OBECNÉ POSTUPY	37
4.2.1. Příprava MF	37
4.2.2. Příprava roztoků.....	38
4.3. POPIS PRÁCE	38
4.3.1. Optimalizace složení mobilní fáze.....	38
4.3.2. Optimalizace koncentrace aditiv	39
4.3.3. Optimalizace pH mobilní fáze	39
4.3.4. Optimalizace stacionární fáze	39
5. VÝSLEDKY	41
5.1. Optimalizace složení mobilní fáze	41
5.2. Optimalizace koncentrace aditiv	44
5.3. Optimalizace pH mobilní fáze	45
5.4. Optimalizace stacionární fáze	46
5.4.1. Kolona KINETEX 5 µm EVO C18 (150 mm x 3 mm, 5 µm; Phenomenex)	46
5.4.2. Kolona EXCEL 3 C18 (100 mm x 3 mm, 3 µm; ACE)	46
5.4.3. Kolona TRIARPT PFP (150 mm x 3 mm, 3 µm; YMC).....	47
5.4.4. EXCEL 3 C18-Ar (100 mm x 3 mm, 3 µm; ACE)	48
5.4.5. Kolona EXCEL 3 C18-PFP (100 mm x 3 mm, 3 µm; ACE)	48

5.4.6.	Kolona ARION C18 POLAR (150 mm x 3 mm, 3 µm; Chromservis)	49
5.4.7.	Kolona Acclaim PA2 (150 mm x 3 mm, 3 µm; Thermo Fisher Scientific)	50
5.4.8.	Shrnutí stacionárních fází	51
5.4.9.	Teoretická citlivost	53
6.	DISKUZE	54
7.	ZÁVĚR	56
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	58
9.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	60

1. ÚVOD

Tato diplomová práce se zaměřuje na optimalizaci podmínek metody pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Diplomová práce je součástí projektu Grantové agentury UK (GAUK) s názvem „Komplexní vývoj separační metody pro výzkum katecholaminů v placentě“, který se zabývá vývojem chromatografické metody pro stanovení tyrosinu a jeho významných metabolitů v nekonvenčních biologických matricích. Tento projekt navazuje na spolupráci s katedrou farmakologie a toxikologie.

Významnými metabolity tyrosinu jsou katecholaminy (KA), mezi ně patří dopamin, noradrenalin a adrenalin. KA jsou hormony a neurotransmitery, které se podílí na spoustě fyziologických stavů, jako je stres, úzkost, spánek, paměť a další. Hrají ale důležitou roli i v patologických procesech, jako je například hypertenze, karcinom nadledvin (feochromocytom) a dalších onemocněních, které souvisí s kardiovaskulárním systémem nebo funkcí ledvin. Stanovení KA je velmi důležité z důvodu klinického hodnocení, správné diagnostiky a léčby těchto onemocnění.

Je prokázáno, že KA jsou také produkovány dočasným orgánem, tj. placentou, během těhotenství. Spolupracující katedra farmakologie zkoumá vliv a význam KA na vývoj plodu. Aby se mohl zhodnotit jejich význam na plod, je nejprve důležité vyvinout metodu pro stanovení KA v placentě. Metoda musí být dostatečně citlivá a selektivní.

Teoretická část diplomové práce se zaměřuje na popis tyrosinu a jeho metabolitů, na jejich metabolismus. Dále se věnuje základním informacím o vysokoúčinné kapalinové chromatografii. Na závěr této části jsou shrnuty poznatky z publikací o KA a dalších metabolitech.

V experimentální části jsou popsány výsledky optimalizace metody, a to výběr vhodné mobilní fáze, koncentrace aditiva, pH mobilní fáze a stacionární fáze.

2. CÍL

Cílem této diplomové práce je popsat retenční vlastnosti tyrosinu a jeho metabolitů (L-DOPA, dopamin, adrenalin, noradrenalin, kyselina homovanilová a vanilmandlová) v podmínkách vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi se spektrofotometrickou a fluorimetrickou detekcí. Nejprve bude zkoumán vliv složení mobilní fáze, koncentrace pufru a pH na separaci daných analytů. Po výběru nejvhodnější mobilní fáze bude studován vliv složení stacionární fáze na retenci tyrosinu a jeho metabolitů.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. TYROSIN A JEHO METABOLITY

3.1.1. Tyrosin

Systematický název: (S)-2-amino-3-(4-hydroxyfenyl)propanová kyselina [1]

Sumární vzorec: C₉H₁₁NO₃ [1]

Tyrosin je bílý téměř krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v 96 % ethanolu. Rozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách a ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů. Musí být chráněn před světlem. [1]

Základem chemické struktury tyrosinu je kyselina propanová s navázaným primárním aminem a hydroxyfenylem. Fyzikálně chemické vlastnosti (Mr, pKa, log P) tyrosinu a dalších metabolitů jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tyrosin patří mezi neesenciální kyseliny, tedy kyseliny, které si tělo dokáže vytvořit samo a tím pokrýt potřebu pro organismus. Tyrosin se tvoří z fenylalaninu, který musíme přijímat v potravě. Název tyrosin je odvozen podle sýru, řecky tyros. [2]

Tyrosin je prekurzorem pro biosyntézu katecholaminů a hormonů štítné žlázy (thyroxinu a trijodthyroninu). Zároveň je prekurzorem pro syntézu melaninu, který se podílí na tvorbě pigmentu kůže, vlasů nebo očí. [2]

3.1.2. Levodopa

Systematický název: (S)-2-amino-3-(3,4-dihydroxyfenyl)propanová kyselina [1]

Sumární vzorec: C₉H₁₁NO₄ [1]

Levodopa je bílý nebo slabě nahnědlý krystalický prášek. Těžce rozpustný ve vodě, prakticky nerozpustný v 96 % lihu a etheru, snadno rozpustný v kyselině chlorovodíkové 1 mol/l. [1]

Chemická struktura levodopy je stejně jako u tyrosinu tvořena kyselinou propanovou. Na kyselinu je navázán primární amin a dihydroxyfenyl.

Levodopa je prekurzorem pro dopamin. Klinicky se levodopa používá v terapii Parkinsonovy choroby v kombinaci s inhibitory dopadekarboxylasy. [3]

3.1.3. Katecholaminy

Chemicky jsou katecholaminy monoaminy. Amin skupina je spojena s benzenovým jádrem dvouuhlíkatým řetězcem. Na aromatickém jádru jsou navázány dvě vicinální hydroxy skupiny. Dopamin a noradrenalin jsou primární aminy, adrenalin je sekundární amin.

Dopamin

Systematický název: 4-(2-aminoethyl)benzen-1,2-diol [4]

Sumární vzorec: C₈H₁₁NO₂ [4]

Dopamin je bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Dobře rozpustný ve vodě, methanolu, horkém 95 % ethanolu a ve vodném roztoku alkalických hydroxidů. Prakticky nerozpustný v etheru a chloroformu. Dopamin je citlivý na světlo a extrémně nestabilní v zásaditých roztocích. [4]

Dopamin je hlavní neurotransmitter v extrapyramidovém systému mozku. Je důležitý při regulaci pohybu. Poškození dopaminergních drah je úzce spojeno s Parkinsonovou chorobou. [5,6]

Dopamin působí mimo jiné agonisticky na beta adrenergní receptory. Má pozitivní chronotropní a ionotropní efekt na myokard, což vede ke zvýšení srdeční frekvence a srdeční kontraktility. Dopaminergní receptory se také nacházejí v ledvinách, jejich stimulací dochází k vazodilataci a následnému zvýšení glomerulární filtrace a exkrece sodíku. [5,6]

Noradrenalin

Systematický název: (1R)-2-amino-1-(3,4-dihydrofenyl)ethan-1-ol [7]

Sumární vzorec: C₈H₁₁NO₃ [7]

Noradrenalin je bílý nebo hnědobílý krystalický prášek. Mírně rozpustný ve vodě, etanolu a dichloretheru. Velmi dobře rozpustný v zásadách a zředěné kyselině chlorovodíkové. Je nestabilní na světle a vzduchu. [7]

Noradrenalin, známý jako norepinefrin, působí jako hormon a neurotransmitter v sympatickém nervovém systému. Noradrenalin silně stimuluje alfa receptory. [5,6]

Noradrenalin se používá k léčbě hypotenze a šoku. Může se také použít k lokální zástavě některých typů krvácení. [5,6]

Adrenalin

Systematický název: (1*R*)-1-(3,4-dihydroxyfenyl)-2-(methylamino)ethan-1-ol [8]

Sumární vzorec: C₉H₁₃NO₃ [8]

Adrenalin je bílý krystalický prášek, měnící barvu na vzduchu a světle. Je prakticky nerozpustný ve vodě, v etanolu 96 % a dichlormethanu. Rozpouští se v kyselině chlorovodíkové. [8]

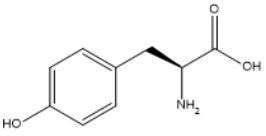
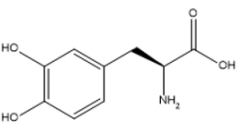
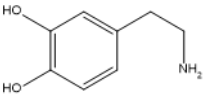
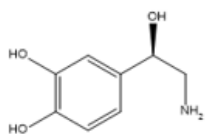
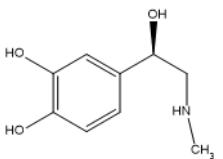
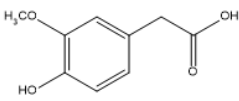
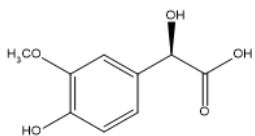
Adrenalin, také známý jako epinefrin, je hormon a neurotransmitter produkováný nadledvinami. Má sympatomimetickou aktivitu, stimuluje jak alfa, tak beta adrenergní receptory. [5,6]

Adrenalin má více indikací. Používá se k okamžité úlevě u hypersenzitivní reakce, zejména při anafylaktickém šoku. Dále je indikován při obnovení srdečního rytmu z různých příčin a může se také použít k prodloužení účinku lokálních anestetik nebo k zástavě některých krvácení. [5,6]

FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI TYROSINU A JEHO METABOLITŮ

Tabulka 1: Fyzikálně-chemické vlastnosti tyrosinu a jeho metabolitů

(hodnoty pKa a log P jsou vypočítány pomocí programu ChemDraw), ostatní hodnoty v tabulce jsou z databáze Reaxys. [9,10, 11, 12, 13,14, 15]

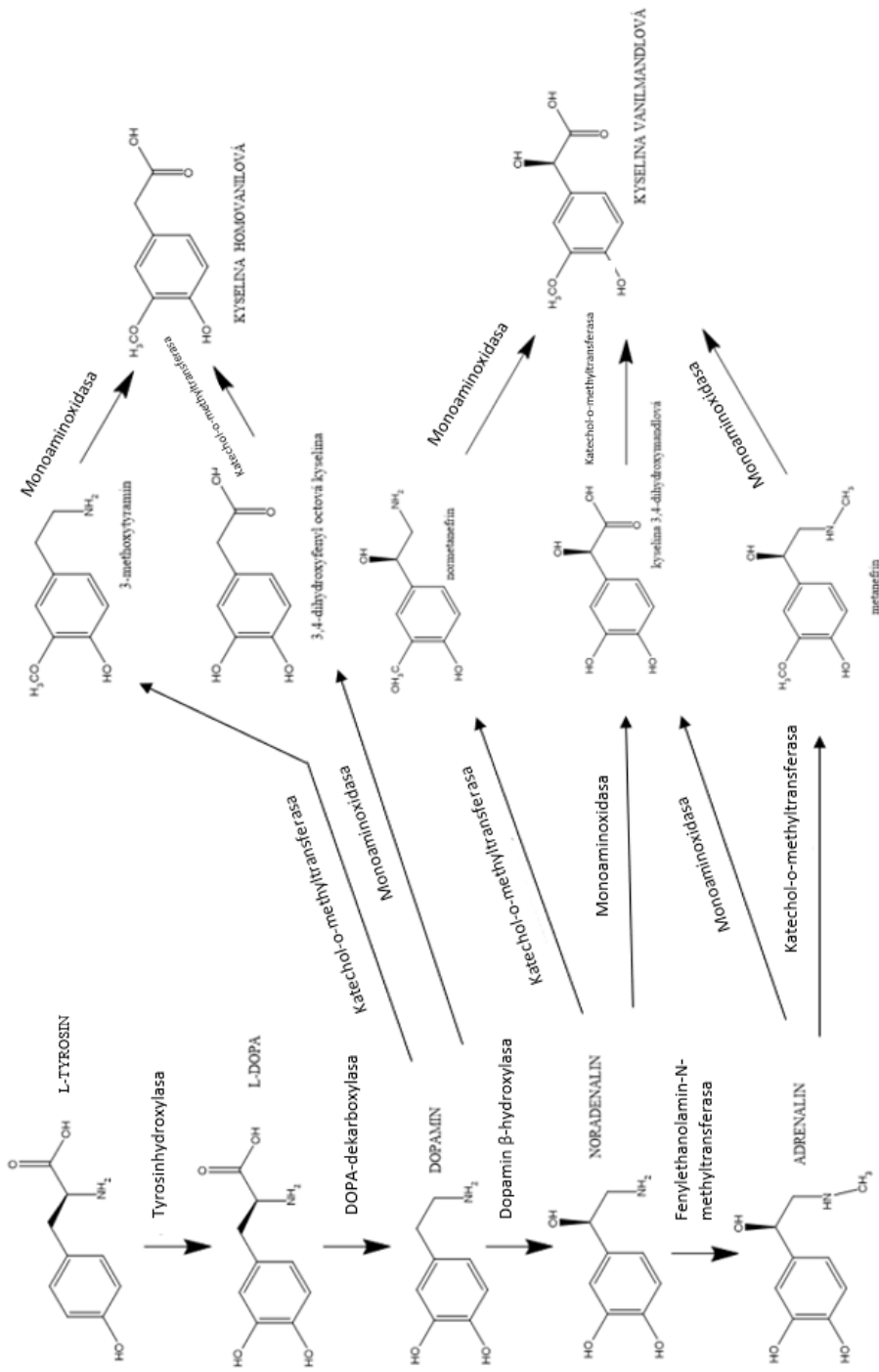
	Mr [g/mol]	pKa	log P
Tyrosin 	181,19	9,346 10,67 2,023	0,39 (ChemDraw) 0,434 (Reaxys)
Levodopa 	197,19	8,699 14,935 10,579 2,123	-0,09 (ChemDraw) -2,03 (Reaxys)
Dopamin 	153,18	8,727 15,251 10,674	0,58 (ChemDraw) 0,651 (Reaxys)
Noradrenalin 	169,18	8,542 15,102 10,001 16,482	-0,24 (ChemDraw) -0,113 (Reaxys)
Adrenalin 	183,20	8,589 15,075 9,923 16,461	0,28 (ChemDraw) 0,277 (Reaxys)
Kyselina homovanilová 	182, 17	9,481 4,382	1,02 (ChemDraw) 0,69 (Reaxys)
Kyselina vanilmandlová 	198,18	9,344 3,410 15,3	0,36 (ChemDraw) 0,301 (Reaxys)

3.2. METABOLISMUS TYROSINU

Počáteční krok v biosyntéze zahrnuje hydroxylaci L-tyrosinu na DOPU. Limitujícím faktorem přeměny je enzym tyrosinhydroxylasa, který určuje rychlost reakce. Následuje přeměna DOPY na dopamin pomocí dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin. Zavedením beta-hydroxylové skupiny pomocí dopaminové β -hydroxylasy se tvoří noradrenalin. Následným přidáním methylové skupiny na aminoskupinu noradrenalinu vznikne adrenalin, tuto reakci ovlivňuje enzym fenylethanolamin-N-methyltransferasa. Poslední reakce probíhá již v dřeni nadledvin. [5,6,16]

Katecholaminy jsou štěpeny dvěma hlavními degradačními enzymy: katechol-o-methyltransferasou (COMT) a monoaminoxidasou (MAO). Hlavní degradační produkty jsou kyselina homovanilová a kyselina vanilmandlová. [5,6,16]

Zjednodušené schéma metabolismu tyrosinu je uvedeno na obrázku 1.



Obrázek 1: Metabolismus tyrosinu. [6,16]

3.3. VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

3.3.1. Obecná charakteristika a princip kapalinové chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) patří mezi nejpoužívanější analytické metody současnosti, uplatňuje se jak ve výzkumu, vývoji i výrobě léčiv a léčivých přípravků. Mezi hlavní výhody HPLC patří univerzálnost, citlivost, selektivita, rychlost a malá spotřeba vzorku. [17,18]

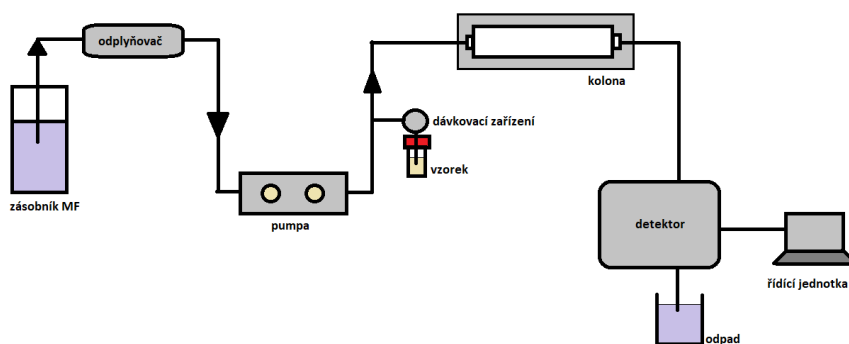
HPLC patří mezi separační metody. Princip je založen na rozdílné distribuci látek ve směsi mezi dvě nemísitelné fáze: mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou). V kapalinové chromatografii je mobilní fáze (MF) kapalina, jak vyplývá z názvu. Stacionární fází (SF) může být tuhá látka nebo kapalina ukotvená na tuhém nosiči nebo gelu. SF je umístěna v koloně ve formě sorbentu, kolonou prostupuje MF pod vysokým tlakem. [18]

Aby byla umožněna separace látek, musí existovat fázové rozhraní. Při dělení látek pak dochází k opakovatelnému ustalování rovnováhy mezi MF a SF. Separované zóny analytů vycházející z kolony jsou zaznamenány pomocí detektoru. Grafický záznam odezvy detektoru se nazývá chromatogram. Křivky chromatogramu nazýváme píky, které mají ideálně tvar Gaussovy křivky. [18]

3.3.2. Obecná schéma kapalinového chromatografu

Kapalinový chromatograf se skládá z následujících částí: (obecné schéma je uvedeno na obrázku 2)

- zásobník MF
- odplyňovač (degaser)
- vysokotlaké čerpadlo
- směšovač (mixery)
- dávkovací zařízení (nejčastěji autosampler)
- chromatografická kolona, která se nachází v termostatovaném prostoru
- detektor
- software (počítač) pro vyhodnocení dat. [18]



Obrázek 2: Obecná schéma chromatografu [18]

Zásobníky slouží k uchování MF. Obsahují speciální filtry, které zachycují tuhé částice před vstupem do HPLC systému. [18]

K odplynění MF se používá nejčastěji vakuový odplyňovač (degaser). MF prochází přes polopropustnou kapiláru, jejíž stěny propouštějí pouze plyny. Odstranění plynů z MF je jeden ze základních způsobů, jak eliminovat následující problémy: nestabilitu základní linie, zvýšení šumu detektoru, neopakovatelné retenční časy nebo špatná opakovatelnost dávkovaného objemu vzorku. [18]

Čerpací systémy pro HPLC musí zajistit přívádění MF kontrolovanou průtokovou rychlostí za vysokého tlaku, jinak by mohlo dojít k ovlivnění výsledků analýzy. Kolísání tlaku má být co nejmenší, čehož se dosahuje například průchodem rozpouštědla zařízením na tlumení pulzů. [18]

Při izokratické eluci je po celou dobu analýzy konstantní složení MF, je tedy možné připravit MF manuálně. Ale většinou se i tak dá přednost automatickému směšování. Při použití gradientové analýzy, kdy dochází ke změně složení MF ve prospěch složky s eluční silou, je nezbytné použít program k mísení složek MF. [18]

Rozeznáváme dva typy tvorby gradientu MF, a to směšování za vysokého a nízkého tlaku. Při vysokotlakém mísení má každá složka MF své čerpadlo a je dávkována do směšovací komůrky před kolonou, tj. na vysokotlaké straně systému. U nízkotlakého mísení jsou složky MF míseny za atmosférického tlaku před vstupem do čerpadla ve směšovací komůrce. [18]

Roztok vzorku se dávkuje do protékající MF pomocí dávkovacího zařízení. Účinnost chromatografického procesu závisí do jisté míry i na dávkování vzorku. Při nedokonalém dávkování může docházet k rozmývání píků nebo také k neopakovatelnosti dávkování. V současnosti se v největší míře používá automatický dávkovač – autosampler. Autosampler je spojený se zásobníkem vzorků, ve kterém jsou umístěny vialky. Vialky mohou být různých objemů, ale nejčastěji se používají 2 ml. [18]

Kolona je nejčastěji tvořena nerezovou trubicí, která je naplněna SF, kde dochází k vlastní separaci analytů. Kolona musí odolávat vysokým tlakům, v případě konvenčních HPLC systémů to je 30 MPa. Musí také odolávat chemickému působení MF. Pro analytické účely se dnes používají kolony o vnitřním průměru 2,1 až 5 mm, délce 10 až 300 mm a plněné náplněmi o velikosti částic 1 až 10 μm . Kolona je umístěna v termostatovém prostoru, kolísání teploty totiž může mít vliv na retenční časy a selektivitu analýzy. [18]

Detekci jednotlivých složek vzorku pak umožní detektor, který je umístěn ihned za kolonou. Za ním se může nacházet sběrač frakcí, odpad. [18]

Celý systém je ovládán vhodným softwarem. Systém slouží ke zpracování výsledků a také ke kontrole celého systému (složení MF, tlak, průtok, objem nástřiku). [18]

3.3.3. Stacionární fáze

SF je nepohyblivá složka chromatografického systému, kde dochází k vlastní separaci. Je vyžadováno, aby SF byla chemicky a tepelně stabilní. [18]

SF jsou v následujícím textu rozděleny dle jejich chemického složení.

SF na bázi silikagelu

Silikagel je obecně nejrozšířenější polární anorganický sorbent. Aktivní centra na povrchu silikagelu jsou silanolové skupiny. Skupiny jsou polární a lze je modifikovat kovalentní vazbou. Silikagel má vysokou mechanickou odolnost, což umožňuje jeho použití při vysokých tlacích aplikovaných v HPLC. Je stabilní v rozmezí pH 3-7. Pod pH 3 může dojít ke kyselé hydrolyze silanolových skupin a nad pH 7 se zvyšuje rozpustnost silikagelu. Oba jevy vedou ke ztrátě účinnosti. Klasicky vázané fáze mají dlouhodobou teplotní stabilitu do 60 °C. [18]

Hybridní SF

Hybridní SF se skládá z kombinace anorganické složky – silikagelu a organické složky – polymeru. Kombinací těchto dvou fází dochází k překonání pH nestability silikagelu a mechanické nestability polymerních fází. Navíc tento typ SF oproti silikagelu obsahuje méně volných silanolových skupin a tím je zajištěna lepší symetrie píků. [18]

Oxidy kovů

Stacionární fáze na bázi oxidů patří mezi polární anorganické sorbenty. V HPLC nalezly uplatnění tři typy těchto oxidů: oxid zirkoničitý, oxid hlinitý a oxid titaničitý. Z nichž nejpoužívanější a nejvíce studovaný je oxid zirkoničitý. [18]

Výhodou oproti silikagelu je jejich vysoká chemická i fyzická odolnost. Můžeme pracovat v celém rozsahu pH a při vysokých teplotách (do 200 °C). Nevýhodou je daleko složitější povrchová modifikace oxidu kovů. [18]

Polymerní SF

Polymerní SF jsou v porovnání se silikagelem stabilní v celém rozsahu pH a i při vysokých teplotách. Tento typ SF je kompatibilní s běžnými organickými rozpouštědly používanými pro aplikaci na reverzních fázích (RP). Nevýhodou však může být bobtnání či srážení těchto fází při vysokém obsahu organické složky v MF. Nejčastěji je využíván kopolymer styrenu a divinylbenzenu. [18]

Porézní grafitizovaný uhlík

Materiál je tvořen plně porézními pláty hexagonálně uspořádaných atomů uhlíku. Je odolný v celém rozsahu pH, při vysokých teplotách (200 °C) a je dobře mechanicky odolný (odolá tlaku i 600 barů). Svými retenčními vlastnostmi se výrazně liší od silikagelových i polymerních fází. Má o něco vyšší afinitu k aromatickým a polárním látkám. Což je vysvětlováno přítomností delokalizovaných π -elektronů na povrchu uhlíkového sorbentu, který vede ke specifickým interakcím sorbent – analyt. [18]

3.3.4. Separační módy

Podle charakteru SF a MF můžeme rozlišit tyto základní separační módy.

Chromatografie na normálních fázích (NP)

Jedná se o historicky nejstarší mód separace. SF je polární, nejčastěji tvořena silikagelem, případně může být povrch silikagelu chemicky modifikován navázáním polárních skupin, ať už kyano nebo amino skupinou. Jako MF se využívají nepolární rozpouštědla, například hexan, dichlormethan nebo chloroform. Mechanismus retence je založen hlavně na polárních interakcích. Především na vodíkových vazbách a interakcích dipól-dipól. Separace na NP v současné době ustupuje do pozadí. [18]

Chromatografie na reverzních fázích (RP)

Tento typ separace je nejčastěji používaný mód ve farmaceutické analýze, a ani u stanovení tyrosinu a jeho metabolitů tomu není výjimkou. SF má nepolární charakter, nejčastěji je SF tvořena silikagelem modifikovaným hydrofobními funkčními skupinami (C₈, C₁₈). MF je polární, zpravidla tvořena směsí organické a vodné složky. Jako organická složka se nejvíce používá methanol, acetonitril nebo tetrahydrofuran. Hlavním mechanismem retence jsou hydrofobní interakce, především van der Waalsovy síly. [17, 18]

Při stanovení tyrosinu a jeho metabolitů převažuje použití silikagelu modifikovaného C₁₈ skupinou. Dále se používá k separaci silikagel modifikovaný C₈ skupinou, C₃₀ skupinou, bifenylem nebo také chemicky navázaným pentafluorphenylem (PFP). [19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33]

Silně polární a iontové látky jsou na nepolární SF zadržovány velmi slabě a eluují se v mrtvém objemu kolony. Chování látek iontové povahy lze ovlivnit úpravou pH pomocí roztoků pufrů. Je možné potlačit ionizaci funkční skupiny (snížením pH u kyselých, zvýšením pH u bazických skupin), tím snížit polaritu a zároveň zvýšit retenci analytu. [18]

Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)

HILIC nachází uplatnění při analýze velmi polárních nebo ionogenních látek především tehdy, když látky nemají dostatečnou retenci i přes vysoký podíl vodné složky MF při chromatografii na RP. Za podmínek HILIC je SF polární, vzniká tzv. pseudostacionární fáze, kdy je voda navázána na povrch SF. Jako SF se využívá především silikagel – čistý, nebo modifikovaný polární funkční skupinou. MF je složena převážně z acetonitrilu a 5-40 % vodného roztoku pufru, který je zde silnější eluční silou. [18, 34]

Iontově výměnná chromatografie (IEC)

IEC chromatografie se využívá hlavně k separaci iontů a ionizovatelných analytů. SF obsahuje iontovou, případně ionizovatelnou skupinu (ionex), která má opačný náboj než separovaný analyt. V případě katexu je na SF navázána molekula s kyselou funkční skupinou, která nese negativní náboj. U anexu je přítomna bazická skupina, která nese pozitivní náboj. MF zároveň obsahuje ionty se stejným nábojem jako je samotný analyt (tzv. proti iont). Retence je založena na kompetici analytů a proti iontů přítomných MF o ionex navázaný na SF. [18]

Studie pro separaci KA uvádí použití silného katexu (SCX) na bázi silikagelu nebo polymeru. Silikagel nebo polymer je modifikován kyselinou sulfonovou, která nese negativní náboj v celém rozsahu pH. [35,36]

Chirální chromatografie

Tyrosin, levodopa, noradrenalin, adrenalin a kyselina vanilmandlová (VMA) mají chirální centrum, pro jejich separaci je možné využít i chirální chromatografie. Chirální separace je využita především při hodnocení čistoty léčiv. Prostorové uspořádání molekuly má vliv na jeho účinek, například D-izomer adrenalinu má 1/10 účinku L-izomeru. V současnosti se pro separaci optických izomerů využívají dva přístupy, nepřímý a přímý. [18, 37]

Nepřímý přístup je založen na reakci racemátu s opticky čistým derivatizačním činidlem. Vzniknou dva diastereomery, které je možné separovat v běžném achirálním prostředí HPLC systému. [18]

Během přímého přístupu je chirální selektor součástí SF nebo MF (elektrolytu). Vznikají dočasné diastereomerní komplexy, kdy látka s vyšší afinitou k selektoru je eluována později. Jako chirální SF se používají například proteinové SF (na bázi hovězího sérového albuminu), polysacharidové SF (triestery nebo trikarbamáty celulózy), cyklodextrinové SF, makrocyclická antibiotika (vankomycin) a další. [18]

3.3.5. Detektory

Ideální HPLC detektor by měl být vysoce citlivý, univerzální, specifický, předvídatelný, snadno použitelný, lineární, nedestruktivní, měl by mít signál nezávislý na složení MF, průtoku a změně teploty. [18]

Protože tyrosin a jeho metabolity jsou v biologických vzorcích v extrémně nízkých koncentracích, je potřeba velmi specifická a citlivá metoda. Detekci výše uvedených analytů lze provést různými detekčními metodami. HPLC s elektrochemickou detekcí je nejčastěji používaná technika. Následuje fluorimetrická detekce, kdy je možné změřit nativní fluorescenci analytů, nebo fluorescenci po derivatizační reakci. Hmotnostní spektrometrie se v poslední době stala velmi populární metodou díky vysoké strukturální specifičnosti. Některé studie popisují stanovení pomocí UV detekce. V neposlední řadě lze stanovit analyty pomocí chemiluminiscenční detekce. Výhody a nevýhody jednotlivých detekcí jsou popsány dále. [16]

Elektrochemická detekce (ECD)

Katecholaminy jsou elektroaktivní sloučeniny, snadno se oxidují na chinony a je tedy možné je detekovat pomocí elektrochemických detektorů. Pomocí ECD měříme elektrickou veličinu, potenciál nebo proud, vyvolanou průchodem látky průtokovou celou. Měřený elektrický signál je úměrný látkovému množství detekované látky. [16, 18]

Tento typ detekce má vysokou citlivost a selektivitu, ale má také řadu nevýhod. Detektor je náchylný ke kolísání rychlosti čerpání MF, zvyšuje se tím poměr signálu k šumu, což může mít vliv na citlivost detekce. Spolehlivost detekce může být také narušena zanášením elektrod. Na elektrodách dochází k usazování oxidovaných látek, což vede ke zeslabení signálu. Abychom

zabránili snížení citlivosti, musí se detektor pravidelně čistit. Nejčastěji se používá pracovní elektroda ze skelného uhlíku a jako referenční elektroda argentchloridová. Dalším faktorem, ovlivňujícím detekci, je MF. Ta musí být čistá, odplyněná a má mít nízkou vodivost. Navíc je výhodné preferovat izokratickou eluci. [18]

Pro detekci katecholaminů se častěji, než amperometrie používá coulometrie. Coulometrie je citlivější a selektivnější metodou, má nižší mez detekce a používají se nižší objemy vzorků. [26]

Fluorimetrická detekce

Fluorimetrické detektory jsou založeny na principu fluorescence analytu a následném měření sekundárního, emisního záření, které látka vyzařuje po absorpci primárního excitačního záření. Oproti UV/VIS detekci jsou významně citlivější a selektivnější, ale jsou použitelné pouze pro látky, které fluorescenci vykazují. [17, 18]

Fluorimetrická detekce je velmi oblíbený způsob detekce tyrosinu a jeho metabolitů. Tyto látky totiž vykazují přirozenou fluorescenci. Nativní fluorescence se dá použít k detekci standardních vzorků. Nativní fluorescence není však dostatečná pro kvantifikaci v reálných vzorcích, kde se analyty nacházejí ve velmi nízkých koncentracích. V biologických vzorcích je tedy nutné pro zvýšení citlivosti využít derivatizační reakcí. [38]

Derivatizaci s fluorescenčním činidlem lze rozdělit podle místa, kde probíhají, následovně: předkolonová, postkolonová a derivatizace na koloně. Derivatizační postup musí být optimalizován s ohledem na koncentraci použitého derivatizačního činidla, teplotu a čas reakce. [18]

V literatuře jsou popsána různá derivatizační činidla. Například pro předkolonovou činidlo 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chlorid (FMOC), difenylethylendiamin, dansylchlorid, benzylamin, pro postkolonovou derivatizaci je popsán ethylendiamin nebo terbium a mnoho dalších činidel. Vlnové délky excitace a emise závisejí na derivatizačním činidle. [38, 22, 39, 20, 35, 40, 41]

Ve výsledku je fluorimetrická detekce citlivá a selektivní metoda pro stanovení našich analytů. Nevýhodou je derivatizační krok, který může být časově náročný a pracný. [18]

Hmotnostní spektrometrie (MS)

Spojení kapalinové chromatografie (LC) s hmotnostní spektrometrií patří v současnosti k hlavním trendům v oblasti farmaceutické analýzy, a to i v detekci námi stanovovaných analytů. [18]

Hmotnostní spektrometry jsou velmi specifické, kromě údajů z chromatogramu poskytují údaje o identitě látky. Proces analýzy látek MS spektrometrem se odehrává ve třech krocích. Nejprve musí dojít k ionizaci vzorku, kdy jsou neutrální molekuly převedeny na ionty. Poté následuje rozdělení iontů podle poměru m/z a jejich urychlení v analyzátoru. Nakonec proběhne detekce iontů a zesílení signálu v detektoru. Výsledkem je hmotnostní spektrum, to je závislost relativní intenzity jednotlivých iontů na jejich poměru m/z . [17, 18]

Konkrétní ionizační technika se vybírá zejména podle polaritě a molekulové hmotnosti analytů. Pro tyrosin a jeho metabolity se volí převážně technika ionizace elektrosprejem (ESI). Jedná se o měkkou ionizační techniku, která je vhodná pro analýzu polárních a středně polárních analytů. Má schopnost vytvářet vícenásobně nabitě ionty, je vhodná pro ionizaci jak malých molekul, tak vysokomolekulárních látek. [18]

Podle napětí, které vkládáme na iontový zdroj, může ionizace probíhat v kladném nebo záporném módu. Kyselé analyty jako je kyselina vanilmandlová (VMA) a homovanilová (HVA) jsou obvykle detekovány pomocí ionizace elektrosprejem v negativním režimu. Na iontový zdroj je vloženo záporné napětí, čímž vznikají deprotonované molekuly, případně záporně nabitě adukty s některou složkou MF. Zatímco analyty jako levodopa, dopamin, noradrenalin, adrenalin a další jsou detekovány v pozitivním režimu. V pozitivním režimu vzniká protonovaná molekula, případně kladně nabitě sodné nebo draselné adukty, případně adukty s MF. [18, 32, 42, 43, 44]

Spektrofotometrické detektory (UV/VIS detektory)

UV/VIS detekce je založena na schopnosti látek absorbovat v UV záření, případně ve viditelné oblasti spektra. Kvantitativní hodnocení je založeno na Lambert-Beerově zákoně, který vyjadřuje vzájemný vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy, koncentrací absorbující složky, vlastní velikostí absorpce, vyjádřenou jako absorbance.

$$A = \varepsilon \times l \times c$$

Kdy veličina A značí absorbanci, ε je molární absorpční koeficient, l délka kvety v cm, c koncentrace analytu v roztoku (mol/l). [17, 18]

Dle konstrukčního uspořádání můžeme detektory rozdělit na detektory s fixní vlnovou délkou, detektory s měnitelnou vlnovou délkou, detektory s programovatelnou vlnovou délkou a detektory s diodovým polem. [18]

Mezi hlavní výhody UV/VIS detektorů patří snadná obsluha, robustnost, nízká citlivost odezvy na změny složení MF a teploty, což umožňuje využití při gradientových analýzách. Detektory jsou poměrně citlivé pro analyty obsahující chromofor. [18]

Chemiluminiscenční detekce

Chemiluminiscenční detekce je založena na schopnosti látek emitovat luminiscenční záření při chemické reakci, nejčastěji při oxidaci. Chemiluminiscenční systémy se dělí na přímé a nepřímé. Přímý systém měří emitované záření přímo při chemické reakci analytu s chemiluminiscenčním činidlem. Při nepřímém systému analyt ovlivňuje (katalyzuje nebo inhibuje) indikační chemiluminiscenční reakci. Pro detekci KA se používá systém s peroxooxaláty nebo systém s luminolem v alkalickém prostředí. Tento typ detekce v kombinaci s HPLC dosahuje vysoké citlivosti a selektivity v biologických vzorcích. [18, 28, 45, 46, 47]

3.3.6. Validace

Validace je proces, jejímž cílem je dokázat, že chromatografická metoda je spolehlivá a vhodná k účelu, pro který byla vyvinuta. [17]

Existuje řada směrnic, které se zabývají validačním postupem. Ve farmaceutické analýze se uplatňuje zejména směrnice Evropské lékové agentury (EMA, European Medicines Agency), směrnice Mezinárodní konference pro harmonizaci (ICH, International Conference on Harmonisation) nebo Amerického Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (FDA, Food and Drug Administration). [48]

Směrnice FDA a EMA se používá zejména pro validace bioanalytických metod. ICH směrnice je norma, která je vhodná pro analytické metody, které slouží k hodnocení substancí a léčivých přípravků. [48]

Validace obsahuje řadu parametrů, které se hodnotí a které musí daná metoda splňovat. Mezi validační parametry patří selektivita, přesnost, preciznost, detekční limit, linearita, rozsah, robustnost a mnoho dalších parametrů. Lékopisným požadavkem, který je nedílnou součástí určení vhodnosti a validity chromatografického systému, je test způsobilosti chromatografického systému (SST, system suitability test). [17, 48]

3.3.7. Základní chromatografické charakteristiky

Rozlišení

Rozlišení (R_s) udává míru separace jednotlivých látek, přičemž hodnota vyšší než 1,5 odpovídá separaci píků až na základní linii. Rozlišení bylo vypočítáno dle uvedeného vzorce:

$$R_s = \frac{1,18 \times (t_{r2} - t_{r1})}{(w_{h1} + w_{h2})}$$

Veličiny t_{r2} a t_{r1} jsou retenční časy sousedních píků. Veličina w_{h1} a w_{h2} jsou šířky píku v jejich poloviční výšce. [1]

Výškový ekvivalent teoretického patra

Výškový ekvivalent teoretického patra (H) uvádí účinnost chromatografické kolony vztaženou na její délku. Parametr byl vypočítán dle uvedené rovnice,

$$H = L/N$$

kdy N je počet teoretických pater a L značí délku kolony (mm). [18]

3.3.8. Příprava vzorku

Úprava biologických vzorků je před samotnou analýzou stěžejní krok metody. Většina reálných vzorků není přímo kompatibilní s chromatografickými technikami, kterými má být ve finálním kroku analyzována. Důvodem je složitost matrice, vysoký obsah proteinů a mnoha dalších balastních látek, které mohou interferovat se sledovanými analyty. Příprava vzorku má přímý vliv na citlivost, selektivitu i reprodukovatelnost analýzy. Dále je cílem zvýšit koncentraci analytu ve vzorku a tím zvýšit i citlivost metody. Volba metody závisí na struktuře analytu, stabilitě, výtěžnosti a afinitě k proteinům. [18, 49]

Extrakce biologických tekutin

Precipitace proteinů

Nejstarší metodou pro přípravu vzorku je srážení proteinů. Precipitace proteinů je rychlá, snadná a poměrně efektivní metoda. Nedochozí k odstranění dalších endogenních látek, část analytu může být ztracena kvůli vazbě na precipitát a dojde k naředění vzorku. Tato metoda přípravy vzorků pro tyrosin a jeho metabolity není často používanou metodou. [18, 50]

Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE, liquid-liquid extraction)

Další používanou metodou je extrakce z kapaliny do kapaliny. Principem této metody je separace analytu mezi dvě nemísitelné fáze. Metoda má dobrou reprodukovatelnost, umožní zakoncentrování analytu a má dobrou výtěžnost. To už ale neplatí pro velmi polární látky, kde má metoda nižší hodnoty výtěžnosti, protože látky neochotně přecházejí do nepolární vrstvy. Hlavní nevýhodou této metody je časová náročnost, větší spotřeba rozpouštědel. Metoda je také hůře automatizovatelná. [18, 38, 51]

Extrakce na pevnou fázi (SPE, solid phase extraction)

V současné době je nejpoužívanější metodou pro tyrosin a jeho metabolity extrakce na pevnou fázi. Princip SPE je obdobný jako princip HPLC, dochází k dělení analytu mezi dvě nemísitelné fáze, z nichž jedna je pevná. SPE je velmi efektivní metoda, má vysokou výtěžnost, je selektivní, přesná a dochází k zakoncentrování analytu. K dispozici je několik typů kolonek pro SPE. Pro tyrosin a jeho metabolity se například používají kolonky na bázi silikagelu modifikované skupinou C₁₈, C₃₀, fenyloboritou kyselinou, či difenyloboritou kyselinou. Nevýhodou této metody je vyšší cena, spotřeba rozpouštědla a kolonek, práce, čas a personál. [18, 28, 41, 31, 33, 30]

Extrakce biologických tkání

KA se stanovují z tkání nadledvin nebo mozku. To vyžaduje jejich homogenizaci s přidáním tlumivého roztoku, jako je fosfát a fosforečnan sodný, alternativně se dá použít kyselina chloristá. Postupy se provádí při nízkých teplotách (4 °C) nebo na ledu. K homogenátu je nutné přidat konzervační látku (například kyselinu askorbovou). Extrakty je třeba před nástřikem do HPLC systému přefiltrovat. [16, 23, 35, 52, 53]

3.4. STUDIE PRO STANOVENÍ TYROSINU A JEHO METABOLITŮ

Tabulka 2: Studie č.1 HPLC s fluorescenční detekcí [34]

Stanovované látky	adrenalin (A), noradrenalin (NA), dopamin (D), 3,4-dihydroxyphenylalanin (DOPA), 3,4-dihydroxyphenyloctová kyselina (DOPAC), 3,4-dihydroxyphenylglykol (DHPG), 3,4-dihydroxymandlová kyselina (DHMA) vnitřní standart (IS): 3,4-dihydroxybenzylamin (DHBA)
Vzorek	moč
Způsob izolace	SPE
SF	ZIC-cHILIC (150 mm x 2,1 mm, 3 µm)
MF, izokratická eluce	ACN (acetonitril):10 mM mravenčan amonný (75:25)
pH MF	2,5
Objem nástřiku (µl)	5
Teplota (°C)	35
Průtoková rychlost (ml/min)	0,2
Doba analýzy (min)	15
Detekce	fluorescenční (emisní 320 nm, excitační 280 nm)

Tabulka 3: Studie č.2 HPLC s fluorescenční detekcí, derivatizační reakce [41]

Stanovované látky	A, NA, D IS: DHBA
Vzorek	moč
Způsob izolace	SPE
SF	BDS-Hypersil (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)
MF, izokratická eluce	MeOH (methanol):50 mmol/ acetátový pufr; 1,1 mmol/l oktansulfonát sodný (SOS); 1,11 mmol/l ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) 15:85
pH MF	4,7
Objem nástřiku (µl)	20
Teplota (°C)	pokojová teplota (20-22)
Průtoková rychlost (ml/min)	1
Doba analýzy (min)	15
Detekce	fluorescenční (emisní 545 nm, excitační 320 nm) derivatizační činidlo: 1mmol/l Terbiumchlorid, 1mmol/l EDTA, 0,5 mol/l NaOH a 20 % MeOH

Tabulka 4: Studie č.3 HPLC s LC/MS detekcí [42]

Stanovované látky	A, NA, D, L-DOPA, tyrosin, 3-methoxytyramin, metanephrine, normetanephrine IS: isoproterenol	VMA, HVA, DOPAC, DHMA IS: 5-hydroxy-2-indolkarboxylová kyselina
Vzorek	krysí tkáň nadledvin	
Způsob izolace	homogenizace	
SF	Kromasil™ Cyano (150 mm x 2,1 mm, 5 µm)	Shim-PakVP-ODS (150 mm x 2,0 mm, 5 µm)
MF, izokratická eluce	ACN:vodná fáze (HCOOH) 60:40	
pH MF	3	4,5
Objem nástřiku (µl)	2	
Teplota (°C)	20	
Průtoková rychlost (ml/min)	0,2	
Doba analýzy (min)	10	15
Detekce	LC-MS (ESI – pozitivní mód)	LC-MS (ESI – negativní mód)

Tabulka 5: Studie č.4 HPLC s elektrochemickou detekcí [30]

Stanovované látky	A, NA, D IS: DHBA
Vzorek	lidská plazma
Způsob izolace	SPE
SF	C ₈ (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)
MF, izokratická eluce	methanol:vodná fáze (10,5 g/l citronová kyselina; 20 mg/l EDTA; 20 mg/l 1-oktansulfonát sodný monohydrát; 1 mol/l NaOH) 2,5:97,5
pH MF	2,9 (upraveno pomocí NaOH)
Objem nástřiku (µl)	20
Teplota (°C)	neuveďeno
Průtoková rychlost (ml/min)	1 ml/min
Doba analýzy (min)	9
Detekce	ECD coulometrie

Tabulka 6: Studie č.5 HPLC s chemiluminiscenční detekcí, předkolonová derivatizace 1,2-bis(3-chlorfenyl)ethylendiaminem [48]

Stanovované látky	A, NA, D IS: isoproterenol
Vzorek	SPE
Způsob izolace	plazma
SF	TSK gel ODS-120 T (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)
MF, izokratická eluce	120 mM imidazolový pufr:MeOH:ACN 13:4:8
pH MF	5,8
Objem nástřiku (µl)	100
Teplota (°C)	24-25
Průtoková rychlost (ml/min)	0,8
Doba analýzy (min)	32 minut
Detekce	chemiluminiscence (1,2-bis(3-chlorfenyl)ethylendiamin)

4. METODICKÁ ČÁST

4.1. CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE, POMŮCKY

Chemikálie

- (+)-adrenalin hydrochlorid: Sigma-Aldrich, Německo
- citrát sodný: Penta s.r.o., Česká republika
- dihydrogenfosforečnan sodný: Penta s.r.o., Česká republika
- 3,4-dihydroxy-L-phenylalanin: Sigma-Aldrich, Německo
- DL-noradrenalin-hydrochlorid: Sigma-Aldrich, Německo
- dopamin hydrochlorid: Sigma-Aldrich, Německo
- hydrogenfosforečnan sodný: Penta s.r.o., Česká republika
- hydroxid sodný koncentrovaný (Český lékopis, ČL): Penta s.r.o., Česká republika
- kyselina DL-4-hydroxy-3-methoxymandlová: Sigma-Aldrich, Německo
- kyselina fosforečná 85-88 %: Penta s.r.o., Česká republika
- kyselina homovanilová: Sigma-Aldrich, Německo
- kyselina mravenčí 88 %: Penta s.r.o., Česká republika
- kyselina octová 99 %: Penta s.r.o., Česká republika
- L-tyrosin: Sigma-Aldrich, Německo
- methanol: Sigma-Aldrich, Německo
- octan amonný: Penta s.r.o., Česká republika
- voda čištěna reverzní osmózou

HPLC sestava

- HPLC jednotka: Shimadzu, Japonsko
- řídicí jednotka: CBM-20A
- degasser: DGU-20A₃
- čerpadlo: LC-20AD_{xr}
- autosampler: SIL-20AC_{xr}
- termostat kolony: CTO-20AC Shimadzu
- detektory: UV-VIS SPD-20A, FLUORESCENCE RF-10A_{XL}
- PC program: Lab Solutions, version 5.97 SP 1

Přístroje

- analytické váhy – Sartorius A200S Electronic Analytical Balance, Santorius analytical, Německo
- magnetická míchačka: Color squid, Ika Werke, Německo
- odsávačka MEVACS M46
- pH metr: SCHOTT CG 843, Schott Instruments GmbH, Německo
- ultrazvuková lázeň: Kraintek K-10, KRAINTEK s.r.o., Česká republika
- vortex: VELP Scientifica, Itálie

Laboratorní pomůcky

Automatické pipety, digestoř, Eppendorf zkumavky, filtrační baňky, filtry (velikost pórů 0,22 μm), kádinka, kopistky, laboratorní lžičky, míchadlo, odměrné válce, septa, skleněná fritá, skleněné tyčinky, stojan na zkumavky, stříčka, špičky, váženky, vialky, víčka, zkumavky.

4.2. OBECNÉ POSTUPY

4.2.1. Příprava MF

V tabulce číslo 7 jsou uvedeny připravované mobilní fáze a jejich výsledné pH. Pro přípravu mobilních fází byla použita ultra čistá voda a organická rozpouštědla v kvalitě čistoty vyšší než 99,9 % (LC-MS quality). Předem vypočítaný objem aditiva byl zředěn (resp. navážka byla rozpuštěna) ve vodě. Připravený vodný roztok byl promíchán na magnetické míchačce a po ustálení byla změřena výsledná hodnota pH pomocí skleněné elektrody. Při přípravě MF 3 až 8 bylo pH upraveno daným aditivem (dle tabulky 7). Připravený roztok byl přefiltrován nejprve přes skleněnou fritu a následně přes filtr o velikosti pórů 0,22 μm .

Bylo důležité se ujistit, že použitý pufr je kompatibilní s organickou složkou MF, protože mnohé pufrы se mohou při smísení s organickým rozpouštědlem vysrážet. Prakticky byl smísen připravený vodný pufr s methanolem v malém objemu mimo systém HPLC a to v poměru, který byl očekáván při samotné analýze. V případě sražení byl pozorován vznik zákalu, resp. sraženiny. Právě z těchto důvodů byla u MF 5, 7 a 8 použita nižší koncentrace aditiv než u ostatních MF.

Tabulka 7: Přehled mobilních fází

Označení	Složení vodné fáze	pH
MF 1	100 mM CH_3COOH	2,84
MF 2	100 mM HCOOH	2,25
MF 3	100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{H}_3\text{PO}_4$	2,50
MF 4	100 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4 + \text{CH}_3\text{COOH}$	4,50
MF 5	25 mM kyselina citronová + citrát sodný	4,50
MF 6	100 mM $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{NaOH}$	4,50
MF 7	25 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{H}_3\text{PO}_4$	6,50
MF 8	25 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{NaOH}$	6,50

4.2.2. Příprava roztoků

Zásobní roztoky tyrosinu a jeho metabolitů (L-DOPA, dopamin, noradrenalin, adrenalin, kyselina homovanilová a kyselina vanilmandlová) byly připraveny navážením minimálně 0,5 mg standardní látky a rozpuštěním v patřičném objemu methanolu, a to tak, aby výsledná koncentrace roztoků byla 0,1 mg/ml. Kvantitativního rozpuštění bylo dosaženo pomocí ultrazvukové lázně. Takto připravované zásobní roztoky byly uchovávány v mrazícím boxu (-20 °C).

Roztoky standardů pro analýzu byly získány ředěním zásobních roztoků na koncentrace 1 µg/ml. Stejným způsobem byla připravena i směs všech analytů.

4.3. POPIS PRÁCE

Analyty byly detekovány metodou HPLC s UV a fluorescenční detekcí. Bylo zkoumáno retenční chování tyrosinu a jeho metabolitů v závislosti na měnících se podmínkách separace (složení MF, koncentrace pufru, pH MF a typ SF) a to s cílem vybrat nejvhodnější podmínky separace, které umožní dělení píků na základní linii při zachování přijatelného času analýzy.

4.3.1. Optimalizace složení mobilní fáze

Nejprve bylo potřeba vybrat nejvhodnější složení MF. Použité MF jsou uvedeny v tabulce 7. MF byly vybrány tak, aby měly různá složení a pokryly rozmezí pH vhodné pro stanovení analytů (od 2,25 do 7). Pro prvotní experimenty byla vybrána kolona KINETEX 5 µm EVO C18 (150 mm x 3 mm, 5 µm; Phenomenex). SF na bázi silikagelu modifikovaného skupina C₁₈ je nejčastěji používaná SF pro separaci našich analytů, proto byla zmíněná kolona využita jako referenční. Analyzováno bylo celkem 7 zmíněných analytů. Z důvodu vyšší retence (nižší polarity) kyselin homovanilové a vanilmandlové byla využita gradientová eluce.

MF byla tvořena směsí vodné složky (A) a organickou složkou (B). Jako organická fáze byl použit methanol. Během změny podmínek separace byla kolona ekvilibrována po dobu 20 minut. Podmínky separace jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8: Pilotní podmínky separace použité pro optimalizaci složení MF

HPLC s UV (285 nm) a fluorescenční detekcí (emisní 279 nm, excitační 320)	
SF	KINETEX 5 µm EVO C18 (150 mm x 3 mm, 5 µm; Phenomenex).
Teplota (°C)	25
Objem nástřiku (µl)	5
Gradient	Do 10. minuty izokratická eluce v poměru A:B 95:5. Poté zvyšování na poměr 80:20 během 2,5 minuty. Následovala izokratické eluce do 20. minuty analýzy.
Průtoková rychlost (ml/min)	0,3
Čas analýzy (min)	20

4.3.2. Optimalizace koncentrace aditiv

Dále byla věnována pozornost vlivu koncentrace aditiv v MF 6 (CH₃COOH + NaOH; pH 4,5) na retenční chování analytů. Byly studovány koncentrace 100 mM, 50 mM, 25 mM, 10 mM a 5 mM.

4.3.3. Optimalizace pH mobilní fáze

Podobně jako při optimalizaci koncentrace MF 6 (100 mM CH₃COOH + NaOH) byl také sledován vliv hodnoty pH na separaci námi stanovovaných analytů. Bylo zkoumáno pH 3,5; 4,5 a 5,5. pH mobilní fáze bylo vždy upraveno pomocí koncentrovaného NaOH (ČL) na požadovanou hodnotu.

4.3.4. Optimalizace stacionární fáze

V dalším kroku byl zjišťován vliv SF na retenční chování KA. Jako SF byl použit modifikovaný silikagel C₁₈ skupinou, PFP skupina a dále kombinované SF (kombinace C₁₈ skupiny s aromatickým jádrem, kombinace C₁₈ skupiny s PFP) a na závěr 2 kolony s modifikovanou C₁₈ skupinou a dále nespecifikovanými

polárními skupinami. MF byla zvolena na základě předem zjištěných výsledků. Testované kolony jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9: Kolony testované pro separaci

Název kolony (rozměry; velikost částic)	Typ SF	Výrobce
KINETEX 5 µm EVO C18 (150 mm x 3 mm, 5 µm)	Silikagel modifikovaný C ₁₈	Phenomenex
EXCEL 3 C18 (100 mm x 3 mm, 3 µm)	Silikagel modifikovaný C ₁₈	ACE
EXCEL 3 C18-Ar (100 mm x 3 mm, 3 µm)	Silikagel modifikovaný C ₁₈ a aromatickým jádrem	ACE
EXCEL 3 C18-PFP (100 mm x 3 mm, 3 µm)	Silikagel modifikovaný C ₁₈ a PFP	ACE
TRIARPT PFP (150 mm x 3 mm, 3 µm)	Silikagel modifikovaný PFP	YMC
ARION C18 POLAR (150 mm x 3 mm, 3 µm)	Silikagel modifikovaný C ₁₈ s polárním endcappingem	Chromservis
Acclaim PA2 (150 mm x 3 mm, 3 µm)	Silikagel modifikovaný C ₁₈ s polárním endcappingem	Thermo Fisher Scientific

5. VÝSLEDKY

5.1. Optimalizace složení mobilní fáze

Nejprve bylo důležité vybrat nejvhodnější složení MF. Jako referenční chromatografická kolona pro separaci daných analytů byla vybrána KINETEX 5 μm EVO C18 (150 mm x 3 mm, 5 μm ; Phenomenex) s C₁₈ SF. Retenční vlastnosti analytů ovlivňuje jak pH, tak i samotné složení MF. Závislost retenčních faktorů jednotlivých analytů na složení MF je zpracována na Obrázku 3 a 4.

Při použití MF 1 a 2 pozorujeme nejnižší retenční faktory analytů noradrenalin, adrenalin a dopamin. Adrenalin a noradrenalin se eluují společně s mrtvým časem kolony, navíc dochází i ke koeluci těchto píků. Naopak analyty tyrosin a L-DOPA jsou při použití těchto MF zadržovány lépe oproti ostatním MF.

Složení MF 3 je nejvíce vhodné pro tyrosin, kdy pozorujeme největší hodnotu retenčního faktoru ze všech zkoumaných MF. Při této MF dochází ke koeluci L-DOPA a dopaminu. Navíc by toto složení fáze (fosfátový pufr) nebylo vhodné pro použití LC/MS analýzy.

Z daných MF byla nejméně vhodná MF 4, při jejím použití byl pozorován příliš nízký signál k šumu. Vzhledem k tomu, že naše metoda má být publikována pro reálné vzorky, je potřeba zajistit co nejvyšší citlivost metody.

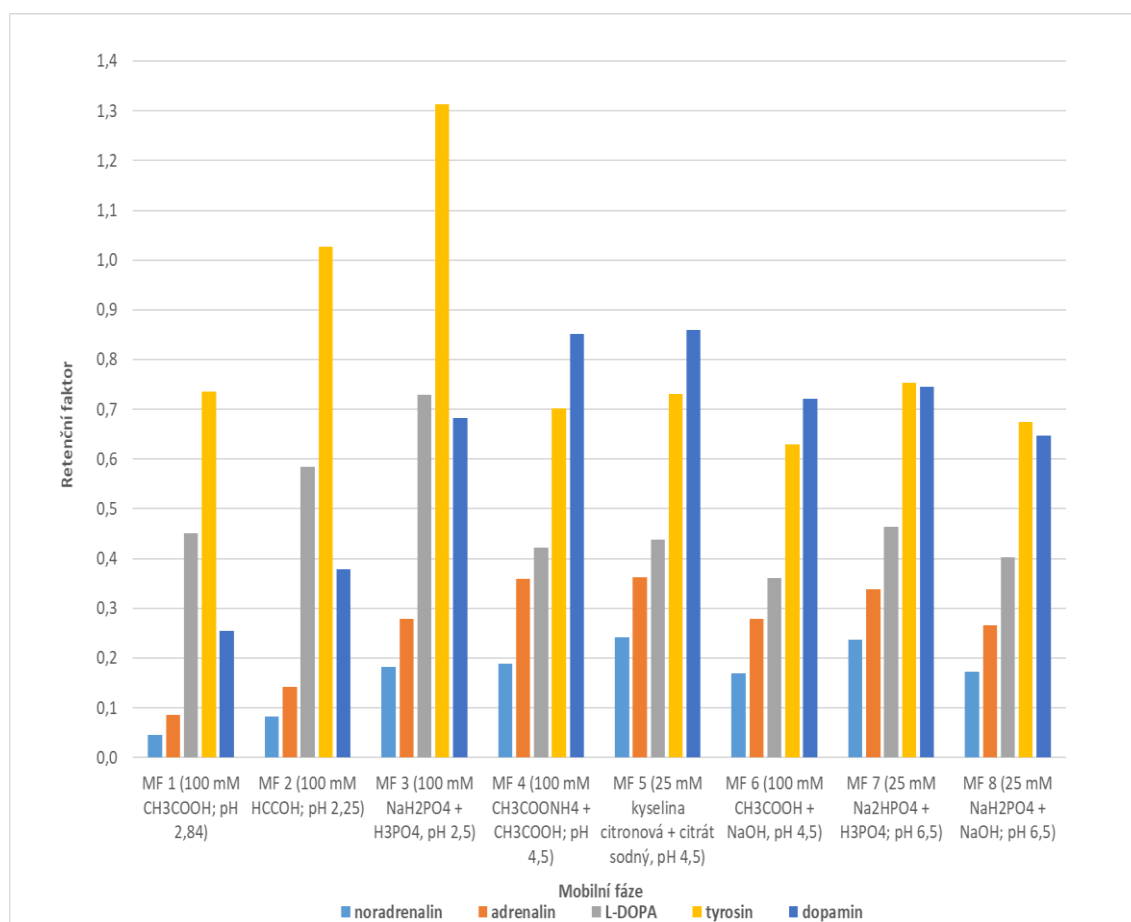
Mobilní fáze 5 a 6 poskytují určitý kompromis retenčních faktorů, nedochází ke koeluci píků. Nevýhodou MF 5 je ale nižší kompatibilita s LC/MS systémem. MF 6 má nejvyšší podíl signálu k šumu, a proto byla vybrána pro další experimenty.

Při pH 6,5, tedy při použití MF 7 a 8 dochází k tailingu píků především analytů s bazickou funkční skupinou. Při použití těchto podmínek dochází také ke koeluci dopaminu a tyrosinu. Tyto MF obsahují fosfátový pufr, takže stejně jako MF 3 nejsou vhodné při analýze LC/MS.

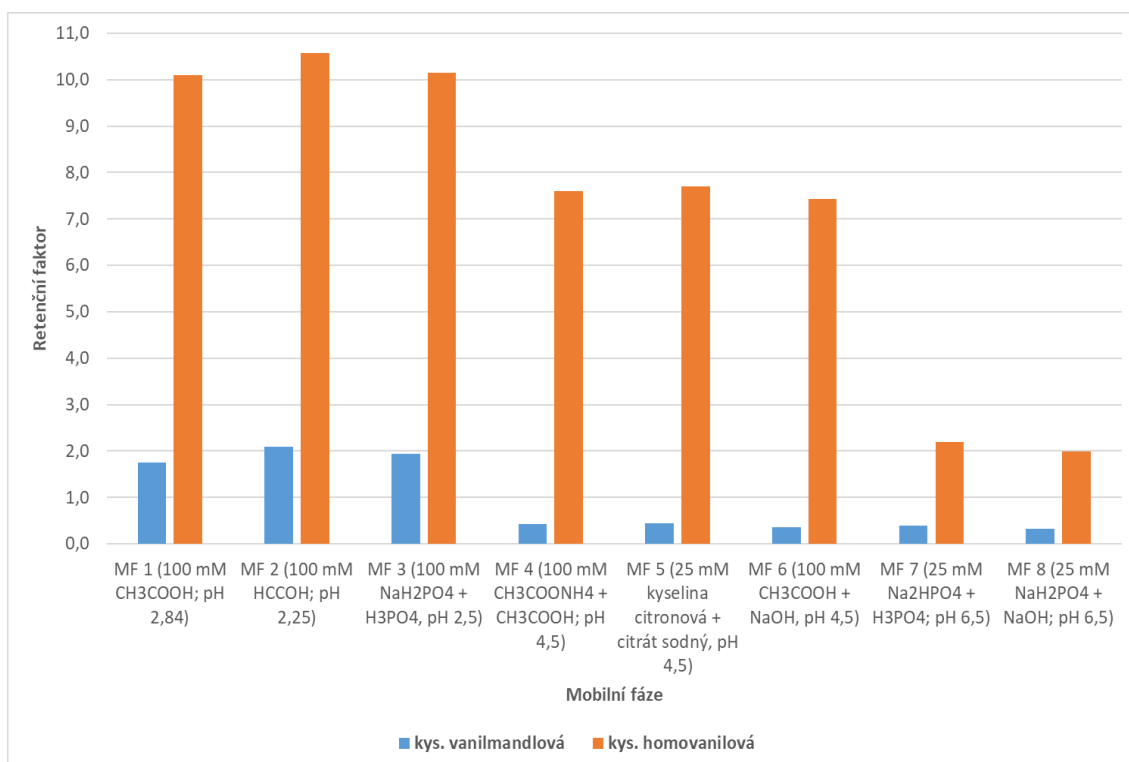
Pro kyseliny homovanilová a vanilmandlová pozorujeme nejvyšší retenci v kyselém prostředí (MF 1-3). Zvyšující se pH má za následek významné snížení jejich retenčních faktorů. Vzhledem k významně vyšší retenci v důsledku odlišných fyzikálně-chemických vlastností kyselin homovanilové a vanilmandlové

byla metoda dále optimalizována pouze pro tyrosin, L-DOPA, dopamin, noradrenalin a adrenalin.

Finální MF byla připravena pipetováním 5,701 ml kyseliny octové (99 %) a doplněna do 1 l vody. pH bylo upraveno koncentrovaným hydroxidem sodným (ČL) na pH 4,5.



Obrázek 3: Retence noradrenalinu, adrenalinu, L-DOPA, tyrosinu a dopaminu při různém složení MF (vodná fáze:MeOH; 95:5). Kolona: KINETEX 5 μ m EVO C18 (150 mm x 3 mm, 5 μ m; Phenomenex).



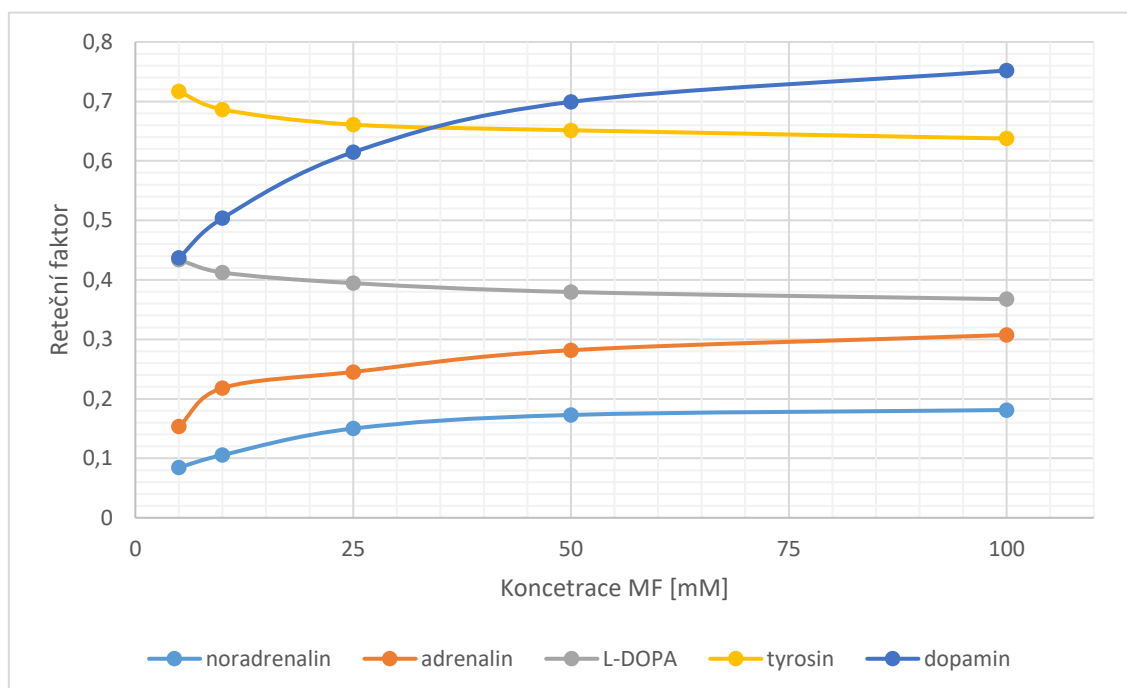
Obrázek 4: Retence kyseliny homovanilové a vanimandlové při různém složení MF (vodná fáze:MeOH; 95:5). Kolona: KINETEX 5 μ m EVO C18 (150 mm x 3 mm, 5 μ m; Phenomenex).

5.2. Optimalizace koncentrace aditiv

U vybrané MF 6 byl zkoumán vliv koncentrace aditiv na retenční vlastnosti analytů (viz. Obrázek 5).

U analytů noradrenalinu, adrenalinu a dopaminu dochází vlivem vyšší koncentrace aditiv k vyšší retenci. Jak je patrné z grafu (Obrázek 5), největší vliv na retenci je právě u dopaminu. Naopak u analytů L-DOPA a tyrosinu pozorujeme mírný pokles retenčního faktoru se zvyšující se koncentrací aditiv.

Jako nejvhodnější pro separaci a retenci analytů byla vybrána koncentrace 100 mM. Pro další experimenty byla použita právě tato koncentrace.



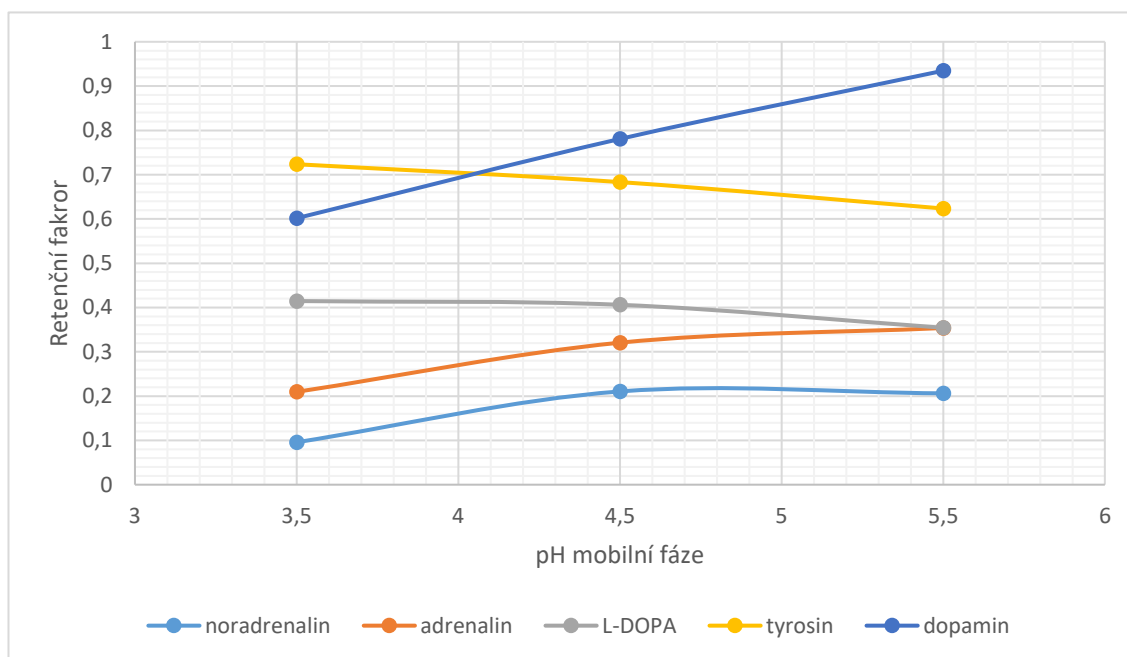
Obrázek 5: Závislost retenčních faktorů analytů na koncentraci kyseliny octové v pufru MF 6. Složení MF 6: vodná složka ($\text{CH}_3\text{COOH} + \text{NaOH}$; 4,5):MeOH; 95:5. Kolona: KINETEX 5 μm EVO C18 (150 mm x 3 mm, 5 μm ; Phenomenex).

5.3. Optimalizace pH mobilní fáze

Námi stanovované analyty patří mezi látky iontové povahy, lze tedy jejich retenční chování ovlivnit úpravou pH MF. Studováno bylo pH v rozmezí 3,5-5,5. Při použití pH nad 7 jsou KA nestabilní, dochází k jejich oxidaci na chinony. Proto je nutné se těmito hodnotám pH vyvarovat.

Noradrenalin má nejnižší retenci při pH 3,5. Při zvyšování pH na 4,5 došlo k nárůstu retenčního faktoru, ale další zvyšování pH mělo nepatrný vliv na jeho retenční vlastnosti. U adrenalinu a dopaminu dochází se zvyšujícím se pH k nárůstu retenčního faktoru. Pravděpodobně to souvisí s aminovou skupinou, která je s rostoucím pH méně ionizována a dané analyty jsou tudíž více zadržovány.

Naopak u L-DOPY a tyrosinu dochází při zvyšujícím se pH ke snížení retenčních vlastností. Jsou to látky kyselé povahy, takže při zvyšujícím se pH se kyseliny více ionizují, jsou více polární a méně se zadržují na koloně. Výsledky měření jsou uvedeny na Obrázku 6.



Obrázek 6: Závislost retenčních faktorů analytů na měnícím se pH MF 6. Složení MF 6: vodná složka (100 mM CH₃COOH + NaOH):MeOH; 95:5. Kolona KINETEX 5 μm EVO C18 (150 mm x 3 mm, 5 μm; Phenomenex).

5.4. Optimalizace stacionární fáze

5.4.1. Kolona KINETEX 5 µm EVO C18 (150 mm x 3 mm, 5 µm; Phenomenex)

Jak již bylo zmiňováno SF s C₁₈, je nejčastěji používanou fází pro separaci KA. Proto byla kolona KINETEX 5 µm EVO C18 (150 mm x 3 mm, 5 µm; Phenomenex) vybrána jako referenční. Daná kolona obsahuje částice typu core-shell (pevné jádro a porézní plášť), které zaručují vyšší účinnost a kratší separaci s relativně nízkým zpětným tlakem. [54]

Jak můžeme pozorovat z naměřených hodnot, tato kolona poskytuje nejnižší hodnoty retenčních faktorů pro všechny studované analyty. Při použití této kolony je rozlišení mezi 1,12 – 4,40, viz. Tabulka 10.

Tabulka 10: Retenční čas (*R_t*) analytů, rozlišení a účinnost kolony KINETEX 5 µm EVO C18 (150 mm x 3 mm, 5 µm; Phenomenex). MF 6 vodná složka (CH₃COOH + NaOH; 4,5):MeOH; 95:5.

	R _t [min]	R _s	H [mm]
noradrenalin	2,19		0,037
adrenalin	2,39	1,65	0,034
L-DOPA	2,55	1,26	0,029
tyrosin	3,09	4,40	0,021
dopamin	3,23	1,12	0,021

5.4.2. Kolona EXCEL 3 C18 (100 mm x 3 mm, 3 µm; ACE)

Druhá studovaná kolona byla EXCEL 3 C18 (100 mm x 3 mm, 3 µm; ACE). Kolona neobsahuje core-shell částice, takže sledujeme u této kolony delší mrtvý čas a dochází tedy k navýšení retenčního faktoru, a to u všech analytů oproti referenční koloně. Nevýhodou této kolony je koeluce píků adrenalinu a L-DOPA, kdy rozlišení je menší než 1, viz. Tabulka 11.

Tabulka 11: Retenční čas analytů, rozlišení a účinnost kolony EXCEL 3 C18 (100 mm x 3 mm, 3 μm; ACE). MF 6 vodná složka (CH₃COOH + NaOH; 4,5):MeOH; 95:5.

	Rt [min]	Rs	H [mm]
noradrenalin	1,88		0,023
adrenalin	2,23	3,33	0,022
L-DOPA	2,29	<1	0,026
tyrosin	2,99	5,51	0,014
dopamin	3,60	4,47	0,013

5.4.3. Kolona TRIARPT PFP (150 mm x 3 mm, 3 μm; YMC)

Dále bylo sledováno retenční chování na koloně TRIARPT PFP (150 mm x 3 mm, 3 μm; YMC) s pentafluorphenylovou skupinou. Oproti SF s C₁₈ skupinou vykazuje tato SF rozdílnou selektivitu vůči aromatickým sloučeninám, a to především z důvodu odlišných interakčních mechanismů. Uplatňují se především mechanismy π-π interakcí, hydrofobních interakcí a vodíkových interakcí.

Kolona poskytuje vyšší retenci pro všechny analyty oproti referenční koloně. Velkou nevýhodou této kolony je koeluce píků L-DOPA a noradrenalinu, kdy rozlišení pro tyto sousedící píky je menší než 1, viz. Tabulka 12.

Tabulka 12: Retenční čas analytů, rozlišení a účinnost kolony TRIARPT PFP (150 mm x 3 mm, 3 μm; YMC). MF 6 vodná složka (CH₃COOH + NaOH; 4,5):MeOH; 95:5.

	Rt [min]	Rs	H [mm]
L-DOPA	4,36		0,022
noradrenalin	4,42	<1	0,025
tyrosin	5,04	3,92	0,019
adrenalin	6,41	7,51	0,026
dopamin	7,82	5,97	0,026

5.4.4. EXCEL 3 C18-Ar (100 mm x 3 mm, 3 µm; ACE)

Tato SF byla vybrána z důvodu kombinace retenčních mechanismů SF na bázi silikagelu s C₁₈ skupinou a aromatickým jádrem. Modifikace silikagelu aromatickým jádrem poskytuje rozdílnou selektivitu k aromatickým látkám z důvodu π-π interakcí mezi SF a analytem.

Tato kolona poskytuje zvýšení retenčních faktorů oproti referenční koloně KINETEX 5 µm EVO C18, při porovnání s kolonou TRIARPT PFP naopak došlo ke snížení retenčních faktorů. Při UV detekci došlo k oddělení píků, hodnoty rozlišení se pohybují mezi 1,47 – 4,75, viz. Tabulka 13.

Tabulka 13: Retenční čas analytů, rozlišení a účinnost kolony EXCEL 3 C18-Ar (100 mm x 3 mm, 3 µm; ACE). MF 6 vodná složka (CH₃COOH + NaOH; 4,5):MeOH; 95:5.

	Rt [min]	Rs	H [mm]
noradrenalin	2,04		0,021
L-DOPA	2,36	2,67	0,022
adrenalin	2,53	1,47	0,015
Tyrosin	2,89	3,13	0,016
dopamin	3,55	4,75	0,013

5.4.5. Kolona EXCEL 3 C18-PFP (100 mm x 3 mm, 3 µm; ACE)

Kolona EXCEL 3 C18-PFP (100 mm x 3 mm, 3 µm; ACE) kombinuje výhodné vlastnosti fází C₁₈ a PFP. Při použití této kolony došlo k oddělení píků až na základní linii, rozlišení se pohybuje mezi hodnotami 2,26 – 8,76, viz. Tabulka 14.

Tabulka 14: Retenční čas analytů, rozlišení a účinnost kolony EXCEL 3 C18-PFP (100 mm x 3 mm, 3 μm; ACE). MF 6 vodná složka (CH₃COOH + NaOH; 4,5):MeOH; 95:5.

	Rt [min]	Rs	H [mm]
noradrenalin	2,33		0,024
L-DOPA	2,76	3,65	0,015
adrenalin	3,08	2,59	0,015
tyrosin	3,41	2,26	0,017
dopamin	4,89	8,76	0,010

5.4.6. Kolona ARION C18 POLAR (150 mm x 3 mm, 3 μm; Chromservis)

Tato kolona obsahuje SF modifikovanou C₁₈ skupinou a dále nespecifikovanými polárními skupinami. U analytů L-DOPA, tyrosinu a dopaminu poskytuje tato kolona nejvyšší naměřené hodnoty retenčních faktorů oproti všem námi hodnoceným kolonám. Kolona poskytla oddělení všech píků až na základní linii (rozlišení mezi 1,83 – 9,85), viz. Tabulka 15.

Tabulka 15: Retenční čas analytů, rozlišení a účinnost kolony ARION C18 POLAR (150 mm x 3 mm, 3 μm; Chromservis). MF 6 vodná složka (CH₃COOH + NaOH; 4,5):MeOH; 95:5.

	Rt [min]	Rs	H [mm]
noradrenalin	3,25		0,015
adrenalin	4,19	6,64	0,017
L-DOPA	4,49	1,83	0,013
tyrosin	6,17	9,85	0,008
dopamin	7,37	5,22	0,012

5.4.7. Kolona Acclaim PA2 (150 mm x 3 mm, 3 µm; Thermo Fisher Scientific)

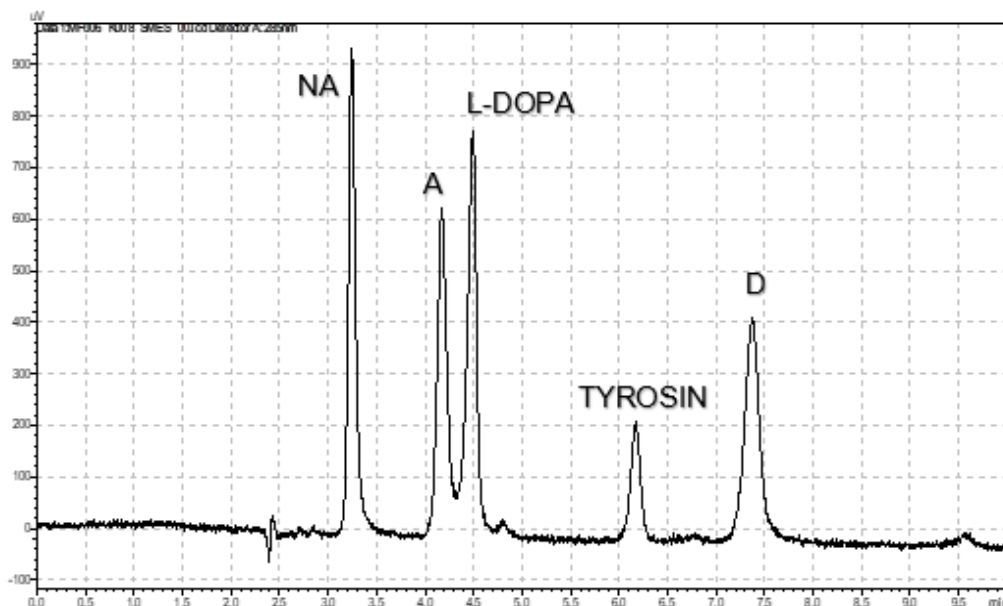
Tato kolona obsahuje podobně jako předchozí C₁₈ skupiny s dále nspecifikovanými polárními skupinami. Oproti referenční koloně došlo k prodloužení retenčních časů u všech analytů, nicméně píky adrenalinu a L-DOPY nejsou odděleny až na základní linii. Rozlišení se pohybuje v rozmezí 1,27 – 7,84, viz. Tabulka 16. Nicméně kolona ARION C18 POLAR poskytla lepší výsledky analýzy, a to jak pro hodnoty retenčních faktorů, tak i v ohledu separace.

Tabulka 16: Retenční čas analytů, rozlišení a účinnost kolony Acclaim PA2 (150 mm x 3 mm x 3 µm; Thermo Fisher Scientific). MF 6 vodná složka (CH₃COOH + NaOH; 4,5):MeOH; 95:5.

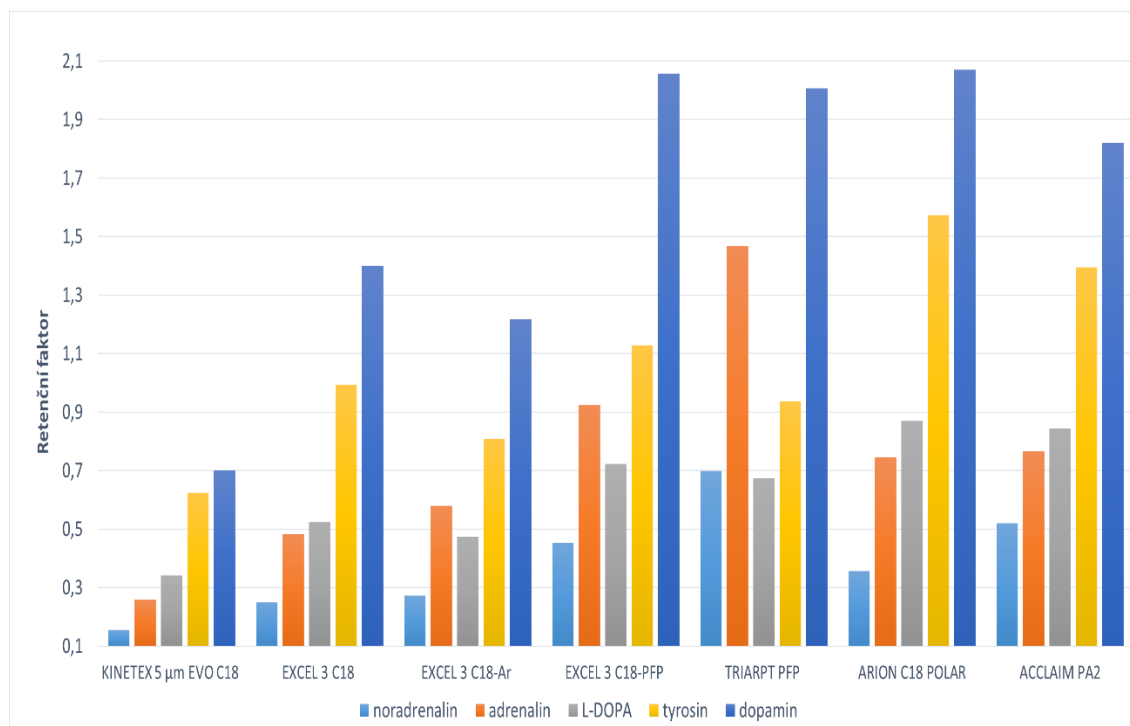
	Rt [min]	Rs	H [mm]
noradrenalin	3,44		0,018
adrenalin	3,99	4,16	0,009
L-DOPA	4,17	1,27	0,014
tyrosin	5,41	7,84	0,010
dopamin	6,38	4,52	0,014

5.4.8. Shrnutí stacionárních fází

Nejlepší výsledky poskytla kolona ARION C18 POLAR. Při použití této kolony byly získány nejvyšší hodnoty rozlišení, chromatogram je uveden na obrázku 7. Na této koloně také dochází k nejvyšší retenci dopaminu, tyrosinu a L-DOPA. Naopak u analytů adrenalin a noradrenalin toto nepozorujeme. Srovnání retenční faktorů jednotlivých kolon jsou uvedeny na obrázku 8.



Obrázek 7: Chromatogram získaný na koloně ARION C18 polar; MF 6 vodná složka (100 mM CH_3COOH + NaOH; 4,5):MeOH; 95:5; průtoková rychlost: 0,3 ml/min; teplota na koloně: 25 °C; UV detekce.



Obrázek 8: Retenční faktory analytů v MF: MF 6 vodná složka (100 mM CH₃COOH + NaOH; 4,5):MeOH; 95:5; na testovaných kolonách:
 KINETEX 5 µm EVO C18 (150 mm x 3 mm, 5 µm);
 EXCEL 3 C18 (100 mm x 3 mm, 3 µm);
 EXCEL 3 C18-Ar (100 mm x 3 mm, 3 µm);
 EXCEL 3 C18-PFP (100 mm x 3 mm, 3 µm);
 TRIARPT PFP (150 mm x 3 mm, 3 µm);
 ARION C18 (100 mm x 3 mm, 3 µm);
 Acclaim PA2 (150 mm x 3 mm, 3 µm).

5.4.9. Teoretická citlivost

Byla také hodnocena teoretická citlivost stanovení při nejlepších podmínkách separace (na koloně ARION C18 POLAR, podmínky separace viz. Tabulka 20). Hodnoty limitu kvantifikace jsou vypočítané, a to při poměru signálu k šumu (S/N) rovnému 10 (viz. Tabulka 17 a 18).

Tabulka 17: Poměr signálu k šumu a detekční limit analytů při UV detekci na koloně ARION C18 POLAR.

	S/N	Limit pro kvantifikaci [μg/ml]
Tyrosin	5,28	1,89
L-DOPA	15,73	0,64
Dopamin	11,19	0,89
Noradrenalin	22,95	0,44
Adrenalin	18,21	0,55

Tabulka 18: Poměr signálu k šumu a detekční limit analytů při fluorescenční detekci na koloně ARION C18 POLAR.

	S/N	Limit pro kvantifikaci [μg/ml]
Tyrosin	68,59	0,15
L-DOPA	162,84	0,06
Dopamin	125,23	0,08
Noradrenalin	180,52	0,06
Adrenalin	197,28	0,05

6. DISKUZE

Náš screening retenčního chování při použití reverzní fáze prokázal krátký retenční čas všech testovaných analytů. Krátký retenční čas se dal předpokládat, protože stanovujeme velmi polární látky, které jsou při použití chromatografie na RP slabě zadržovány, a proto je velmi obtížné je oddělit. Způsoby, jak zvýšit retenční časy, jsou diskutovány níže.

Jak je uvedeno v dostupných studiích, zvýšit retenční čas bazických analytů můžeme přidáním iontově párového činidla. Vyšší koncentrace těchto činidel prodlužuje retenční čas zásad, ale také dobu ekvilibrace kolony a čas na čištění kvůli vysokému obsahu soli. [16]

Další možností, jak zvýšit retenci je použití HILIC módu, který je vhodný pro polární analyty. Navíc slibuje i vhodné tvary píků pro bazické látky, je to vhodná metoda pro spojení s ionizačními technikami používanými při LC/MS analýzách, např. ESI. Výsledky studie 1 používající ke stanovení analytů HILIC mód ukazují vhodné retenční parametry s dostatečným rozlišením. Podmínky separace jsou uvedeny v tabulce 2. V této studii byl také zkoumán vliv pH na separaci analytů (hodnoty pH 2,5 – 4,5). Podobný trend pozorujeme i v našich testovaných podmínkách, které ovšem nejsou HILIC. [34]

Protože se má metoda aplikovat na reálné vzorky placenty, je potřeba zajistit co nejvyšší citlivost a mez detekce. V tabulce 19 jsou uvedeny hodnoty dopaminu, noradrenalinu, adrenalinu v plazmě a moči (hodnoty pro tyrosin a L-DOPA nejsou dostupné). I když neznáme koncentrace analytů v placentě, lze předpokládat nízké hladiny. Dle námi získaných dat (tabulka 17,18) tedy nemá UV ani nativní fluorescence KA potenciál pro stanovení daných látek v reálných matricích.

Tabulka 19: Referenční hodnoty analytů dopamin, noradrenalin a adrenalin v plazmě a moči [55]

	koncentrace v plazmě [ng/l]	koncentrace v moči [> µg/den]
Dopamin		500
Noradrenalin	420	97
Adrenalin	84	27

Koncentrace dopaminu v plazmě stanovit lze, nicméně její stanovení má nízkou výpovědní hodnotu. Dopamin má krátký poločas, jeho koncentrace je ovlivněna vnějšími faktory (například stresem). Odběr vzorku plazmy se provádí za velmi přísných podmínek (vleže, po několika minutách zklidnění). Z těchto důvodů se většinou dopamin stanovuje z moči nebo je možné stanovit jeho odpadní produkt VMA, moč se sbírá po dobu 24 hodin. [56]

Způsob, kterým zajistit vyšší retenci analytů, ale i citlivost metody je použití vhodné derivatizační reakce za vzniku fluorescenčního derivátu. Avšak derivatizační reakce vyžaduje nejen optimalizaci reakčních podmínek (jako je koncentrace použitého činidla, teplota a doba reakce), ale i chromatografických podmínek, protože při předkolonové derivatizaci se bude jednat o separaci strukturně odlišných látek. V dostupných studiích pro detekci KA je zmiňováno mnoho derivatizačních činidel, například dansylchlorid, Fmoc-Cl, ethylendiamin, difenylethylendiamin, terbium, benzylamin a další. [39, 38, 35, 40, 22, 41, 20]

Vhodnou citlivost poskytuje také spojení kapalinové chromatografie s MS detekcí. Studie 3 používá k detekci ionizaci pomocí elektrospreje, což je nejčastěji používaná ionizační metoda při stanovení KA v rámci MS detekce. Limity detekce jsou v rozmezí 0,5-20 ng/ml. Přesnost metody (uvedená jako relativní směrodatná odchylka) je nižší než 5,3 %. Podmínky separace jsou uvedeny v kapitole 3.5 (Tabulka 4). [42]

7. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo popsat retenční chování analytů při rozdílných podmínkách separace. Pro hodnocení analytů byla použita HPLC metoda s UV a fluorescenční detekcí. Celkem bylo studováno 8 analytů: tyrosin, L-DOPA, dopamin, adrenalin, noradrenalin, kyselina homovanilová a vanilmandlová.

Nejprve byl hodnocen vliv složení MF na separaci analytů na námi vybrané referenční koloně KINETEX 5 μm EVO C₁₈ (150 mm x 3 mm, 5 μm ; Phenomenex). Nejlepší výsledky poskytl acetátový pufr s hodnotou pH 4,5 (MF 6). Při použití této MF nedochází ke koeluci píků a je kompatibilní s LC systémem, případně MS detekcí. Proto byla vybrána pro další experimenty, problematika je dále diskutována v kapitole 5.1. Protože kyseliny vanilmandlová a homovanilová mají příliš odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti v porovnání s tyrosinem, L-DOPA, dopaminem, noradrenalinem a adrenalinem byla dále metoda optimalizována pro zbývající analyty.

U MF byl dále zkoumán vliv složení aditiv na retenční chování. Byla sledována koncentrace v rozmezí 10-100 mM. Jako nejlépe hodnocená byla koncentrace 100 mM. Následně byl studován vliv změny pH. U analytů noradrenalin, adrenalin a dopamin dochází se zvyšujícím se pH k nárůstu retenčního faktoru. Pravděpodobně dochází s narůstajícím pH k menší ionizaci aminoskupiny, a proto jsou analyty více zadržovány na koloně. U analytů L-DOPA a tyrosinu je opačná tendence, jedná se o látky kyselé povahy. Při zvyšujícím se pH dochází k jejich ionizaci a zadržují se méně na koloně.

Nakonec byl sledován vliv typu SF na retenci analytů. Celkem bylo studováno 7 různých kolon. Byly studovány kolony se SF na bázi modifikovaného silikagelu C₁₈ skupinami, PFP skupinami, dále kombinované SF (C₁₈ skupina s aromatickým jádrem, kombinace C₁₈ skupina s PFP) a na závěr dvě kolony se skupinou C₁₈ a dále nespecifikovanými polárními skupinami. U kolon byla popsána jejich účinnost, rozlišení, retenční parametry pro dané analyty.

Nejlepší separací bylo dosaženo s kolonou ARION C18 polar. Ačkoli jsou námi stanovované analyty velmi polární a jsou na RP málo zadržovány, podařilo se je oddělit na této koloně s rozlišením mezi 1,83 – 9,85 (viz. Tabulka 15) a to v celkovém čase analýzy do 15 minut. Podmínky separace jsou uvedeny v tabulce 20.

Tabulka 20: Podmínky separace analytické metody

Stanovované látky	NA, A, D, L-DOPA, tyrosin
SF	ARION C18 POLAR (150 mm x 3 mm, 3 µm; Chromservis)
MF, izokratická eluce	100 mM CH ₃ COOH + NaOH:MeOH 95:5
pH MF	4,5 (upraveno NaOH)
Objem nástřiku (µl)	5
Teplota (°C)	25
Průtoková rychlost (ml/min)	0,3
Doba analýzy (min)	15
Detekce	UV (285 nm) a fluorescenční detekce (emisní 279 nm, excitační 320 nm)

Výsledky diplomové práce budou používány pro další vývoj metody pro stanovení KA v placentě. Hlavními cíli bude zvýšit retenci a především citlivost metody pro stanovované analyty.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- A: adrenalin
- ACN: acetonitril
- COMT: katechol-o-methyltransferasa
- ČL: Český lékopis
- D: dopamin
- DHBA: 3,4-dihydroxybenzylamin
- DHMA: 3,4-dihydroxymandlová kyselina
- DHPG: 3,4-dihydroxyphenylglykol
- DOPA: 3,4-dihydroxyphenylalanin
- DOPAC: 3,4-dihydroxyphenyloctová kyselina
- ECD: elektrochemická detekce
- EDTA: ethylendiamintetraoctová kyselina
- EMA: European Medicines Agency, Evropská léková agentura
- ESI: ionizace elektrosprejem
- FDA: Food and Drug Administration, Americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
- FMOC-Cl: 9-fluorfenylmethyloxycarbonyl chlorid
- H: výškový ekvivalent teoretického patra
- HILIC: hydrofilní interakční chromatografie
- HPLC: High Performance Liquid Chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- HVA: kyselina homovanilová
- ICH: International Conference on Harmonisation, Mezinárodní konference pro harmonizaci
- IEC: iontově výměnná chromatografie
- IS: vnitřní standart
- KA: katecholaminy
- LC: kapalinová chromatografie
- LLE: liquid-liquid extraction, extrakce z kapalina do kapaliny
- MAO: monoaminoxidasa
- MeOH: methanol

- MF: mobilní fáze
- MS: hmotnostní spektrometrie
- m/z: poměr hmotnosti a náboje
- NA: noradrenalin
- NP: normální fáze
- PFP: pentafluorphenyl
- RP: reverzní fáze
- Rs: rozlišení
- Rt: retenční čas
- SCX: silný katex
- S/N: poměr signálu k šumu
- SF: stacionární fáze
- SOS: oktansulfonát sodný
- SPE: solid phase extraction, extrakce na pevnou fázi
- SST: systém suitability test, test způsobilosti systému
- UV: oblast ultrafialové světla
- VIS: oblast viditelného světla
- VMA: kyselina vanilmandlová

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] *Český lékopis 2017*. 1. vyd., Grada Publishing, Praha 2017. ISBN 978-80-271-0500-7
- [2] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6057> [staženo 15.9. 2021]
- [3] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6047> [staženo 15.9. 2021]
- [4] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/681> [staženo 15.9.2021]
- [5] ŠVIHOVEC, J. et al. *Farmakologie*. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-247-5558-8
- [6] LINCOVÁ, D.; FARGHALI H. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2007. ISBN 978-80-7262-373-0
- [7] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/439260> [staženo 15.9. 2021]
- [8] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5816> [staženo 15.9. 2021]
- [9] https://www.reaxys.com/#/results/substances/0/H010_30308105155453_75830/SDAxMD1TI0gwMTE9QyNIMDEyPVI=/list/73e315ba-528c-4b82-ad59-26819d2e5385/1/desc/IDE.NUMREF///limit [staženo 4.5. 2021]
- [10] https://www.reaxys.com/#/results/substances/0/H027_30308105155453_75830/SDAyNz1TI0gwMjk9QyNIMDI4PVI=/list/b1eabc88-6b27-4e7f-9623-62979585bd65/1/desc/IDE.NUMREF///limit [staženo 4.5. 2021]
- [11] https://www.reaxys.com/#/results/substances/0/H035_30308105155453_75830/SDAzNT1TI0gwMzc9QyNIMDM2PVI=/list/0bd86121-f02d-4354-934a-ae402e887245/1/desc/IDE.NUMREF///limit [staženo 4.5. 2021]
- [12] https://www.reaxys.com/#/results/substances/0/H046_30308105155453_75830/SDA0Nj1TI0gwNDg9QyNIMDQ3PVI=/list/9b0a630d-3adc-442b-848f-33949eb725cd/1/desc/IDE.NUMREF///limit [staženo 4.5. 2021]
- [13] https://www.reaxys.com/#/results/substances/0/H054_30308105155453_75830/SDA1ND1TI0gwNTU9QyNIMDU2PVI=/list/fae15f9d-8fd3-4246-84d2-31ce80d50941/1/desc/IDE.NUMREF///limit [staženo 4.5. 2021]

- [14] https://www.reaxys.com/#/results/substances/0/H063_3030810515545375830/SDA2Mz1TI0gwNjQ9QyNIMDY1PVI=/list/1a8d13cd-e8da-450a-97c7-e6bcd76be72c/1/desc/IDE.NUMREF///limit [staženo 4.5. 2021]
- [15] https://www.reaxys.com/#/results/substances/0/H074_3030810515545375830/SDA3ND1TI0gwNzY9QyNIMDc1PVI=/list/e94c408f-41ba-464e-a765-2819fc1bf06d/1/desc/IDE.NUMREF///limit [staženo 4.5. 2021]
- [16] BICKER, J. et al. Liquid chromatographic methods for the quantification of catecholamines and their metabolites in several biological samples - A review. *Anal. Chem.*, **2013**, 768, 12-34.
- [17] KLIMEŠ, J. et al. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. 2. vyd., Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové 2015. ISBN 978-80-260-8175-3
- [18] NOVÁKOVÁ, L.; DOUŠA, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1. vyd., Lucie Nováková, Praha 2013. ISBN 978-80-260-4243-3
- [19] WANG, Y. et al. A simple high-performance liquid chromatography assay for simultaneous determination of plasma norepinephrine, epinephrine, dopamine and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1999**, 21, 519-525.
- [20] YAMAGUCHI, M. et al. Determination of Norepinephrine in Microdialysis Samples by Microbore Column Liquid Chromatography with Fluorescence Detection Following Derivatization with Benzylamine. *Anal. Biochem.*, **1999**, 270, 296-302.
- [21] ZHANG, G. et al. Ultra sensitive measurement of endogenous epinephrine and norepinephrine in human plasma by semi-automated SPE-LC-MS/MS. *J. Chromatogr. B*, **2012**, 895, 186-190.
- [22] VAN DER HOORN, F.A.J. et al. Determination of catecholamines in human plasma by high-performance liquid chromatography: comparison between a new method with fluorescence detection and an established method with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B*, **1989**, 487, 17-28.

- [23] CHI, J.D. et al. Simultaneous determination of catecholamines in rat brain tissue by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, **1999**, 731, 361-367.
- [24] VAARMANN, A. et al. Novel and sensitive high-performance liquid chromatographic method based on electrochemical coulometric array detection for simultaneous determination of catecholamines, kynurenine and indole derivatives of tryptophan. *J. Chromatogr. B*, **2002**, 769, 145-153.
- [25] SYSLOVÁ, K. et al. Monitoring of dopamine and its metabolites in brain microdialysates: Method combining freeze-drying with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218, 3382-3391.
- [26] SABBIONI, C. et al. Simultaneous liquid chromatographic analysis of catecholamines and 4-hydroxy-3-methoxyphenylethylene glycol in human plasma: Comparison of amperometric and coulometric detection. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1032, 65-71.
- [27] ZHANG, G. et al. Ultra sensitive measurement of endogenous epinephrine and norepinephrine in human plasma by semi-automated SPE-LC–MS/MS. *J. Chromatogr. B*, **2012**, 895, 186-190.
- [28] NALEWAJKO, E. et al. Determination of catecholamines by flow-injection analysis and high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2007**, 43, 1673-1681.
- [29] NEUBECKER, T. A. et al. Rapid and selective method for norepinephrine in rat urine using reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **1998**, 718, 225-233.
- [30] RAGGI, M.A. et al. Determination of catecholamines in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B*, **1999**, 730, 201-211.

- [31] MACHIDA, M. et al. Simultaneous analysis of human plasma catecholamines by high-performance liquid chromatography with a reversed-phase triacontylsilyl silica column. *J. Chromatogr. B*, **2006**, *830*, 249-254.
- [32] BERGMANN, M.L. et al. Analysis of catecholamines in urine by unique LC/MS suitable ion-pairing chromatography. *J. Chromatogr. B*, **2017**, *1057*, 118-123.
- [33] DE JONG, W.H.A. et al. Automated mass spectrometric analysis of urinary free catecholamines using on-line solid phase extraction. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2010**, *878*, 1506-1512.
- [34] KANAMORI, T. et al. Development of analytical method for catechol compounds in mouse urine using hydrophilic interaction liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, **2015**, *985*, 142-148.
- [35] TSUNODA, M. et al. Simultaneous determination of dopamine and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in mouse striatum using mixed-mode reversed-phase and cation-exchange high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2010**, *51*, 712-715.
- [36] HEIDBREDER, Ch. A. et al. Development and application of a sensitive high performance ion-exchange chromatography method for the simultaneous measurement of dopamine, 5-hydroxytryptamine and norepinephrine in microdialysates from the rat brain. *J. Neurosci. Methods*, **2001**, *112*, 135-144.
- [37] FUKUSHIMA, T. et al. Enantiomeric Separation of d-/l-Norepinephrine and Epinephrine by High-Performance Liquid Chromatography with a b-Cyclodextrin Type Chiral Stationary Phase. *Biomed. Chromatogr.*, **1998**, *12*, 1-3.
- [38] CHAN, E.C.Y. et al. High-performance liquid chromatographic assay for catecholamines and metanephrines using fluorimetric detection with pre-column 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride derivatization. *J. Chromatogr. B*, **2000**, *749*, 179-189.

- [39] NIROGI, R. et al. A sensitive and selective quantification of catecholamine neurotransmitters in rat microdialysates by pre-column dansyl chloride derivatization using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **2013**, 913-914, 41-47.
- [40] TSUNODA, M. et al. Simultaneous determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and homovanillic acid using high performance liquid chromatography–fluorescence detection and application to rat kidney microdialysate. *Anal. Biochem.*, **2002**, 307, 153-158.
- [41] FOTOPOULOU, M. A. et al. Post-column terbium complexation and sensitized fluorescence detection for the determination of norepinephrine, epinephrine and dopamine using high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **2002**, 462, 179-185.
- [42] GU, Q. et al. Analysis of catecholamines and their metabolites in adrenal gland by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **2008**, 609, 192-200.
- [43] MAGERA, M. J. et al. Determination of homovanillic acid in urine by stable isotope dilution and electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 306, 35-41.
- [44] TÖRNKVIST, A. et al. Analysis of catecholamines and related substances using porous graphitic carbon as separation media in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **2004**, 801, 323-329.
- [45] Klouda, P. *Moderní analytické metody*. 3. vyd., Klouda Pavel, Ostrava: Pavko, 2016. ISBN 978-80-86369-22-8
- [46] TSUNODA, M. et al. Simultaneous Automatic Determination of Catecholamines and Their 3-O-Methyl Metabolites in Rat Plasma by High-Performance Liquid Chromatography Using Peroxyoxalate Chemiluminescence Reaction. *Anal. Biochem.*, **1999**, 269, 368-392.

- [47] RAGAB, G. H. et al. Chemiluminescence determination of catecholamines in human blood plasma using 1,2-bis(3-chlorophenyl)ethylenediamine as pre-column derivatizing reagent for liquid chromatograph. *Anal. Chim. Acta*, **2000**, 403, 155-160.
- [48] NOVÁKOVÁ, L.; DOUŠA, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. 1. vyd., Lucie Nováková, Praha 2013. ISBN 978-80-260-4244-0
- [49] SMITH, R. M. et al. Before the injection - modern methods of sample preparation for separation techniques. *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1000, 3-27.
- [50] SZENTIVÁNYL, K. et al. Význam vyšetření hladiny metabolitů biogenních aminů v mozkomíšním moku vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií v diagnostice dětských neurotransmitterových onemocnění. *Klin. Biochem. Metab.*, **2011**, 19, 156-161.
- [51] KAMPERMAN, G.; KRAAK, J.C. Simple and fast analysis of adrenaline and noradrenaline in plasma on microbore high-performance liquid chromatography columns using fluorimetric detection. *J. Chromatogr.*, **1985**, 337, 384-390.
- [52] PATEL, B. A. et al. Simple and rapid determination of serotonin and catecholamines in biological tissue using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B*, **2005**, 818, 269-276.
- [53] YOSHITAKE, T. et al. Determination of serotonin, noradrenaline, dopamine and their metabolites in rat brain extracts and microdialysis samples by column liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine and 1,2-diphenylethylenediamine. *J. Chromatogr. B*, **2004**, 807, 177-183.
- [54] HAYES, R. et al. Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2014**, 1357, 36-52.
- [55] <https://laborator.smn.agel.cz/metody/laboratorni-metody/soubory/adrenali.pdf> [staženo 4.5. 2022]

[56] MUDr. Klapalová, A. Soukromé sdělení.