

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy



**Retenčné správanie katecholamínov  
a ich prekursorov v HILIC podmienkach**

Diplomová práca

**Andrej Tibenský**

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Petr Kastner, PhD.

Hradec Králové, 2023

## **Prehlásenie**

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka použitá literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové dňa 04.05.2023

Andrej Tibenský

## **Pod'akovanie**

Na tomto mieste by som sa rád pod'akoval svojmu školiteľovi PharmDr. Petrovi Kastnerovi, PhD. a konzultantovi Ing. Danielovi Heblíkovi za odborné vedenie, cenné rady, trpezlivosť a čas, ktorý mi venovali pri vypracovaní mojej diplomovej práce. Ďalej by som rád pod'akoval ostatným pracovníkom Katedry farmaceutickej chémie a farmaceutickej analýzy za ich pomoc a vytvorenie príjemného pracovného prostredia na katedre.

Táto diplomová práca vznikla v rokoch 2021 a 2022 za podpory grantového projektu GA UK č. 349 521 a SVV 260 666.

## **Abstrakt**

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

**Kandidát:** Andrej Tibenský

**Vedúci diplomovej práce:** PharmDr. Petr Kastner, Ph.D.

**Názov diplomovej práce:** Retenčné správanie katecholamínov a ich prekursorov v HILIC podmienkach

Témou diplomovej práce bolo skúmanie retenčného správania katecholamínov a ich prekursorov v HILIC podmienkach za použitia spektrofotometrickej a fluorimetrickej detekcie. Skúmaných bolo 5 analytov – adrenalín, noradrenalín, dopamín, L-DOPA a tyrozín. Najskôr bolo retenčné správanie skúmané za použitia LUNA 3  $\mu\text{m}$  (PFP)2 kolóny vykazujúcej RP-LC aj HILIC charakteristiky s 2 rôznymi mobilnými fázami. Prvá bola v zložení 25 mM octovej kyseliny v zmesi acetonitrilu a vody a druhá mobilná fáza pozostávala z 25 mM acetátového pufru (pH 4,50) v zmesi acetonitrilu a vody.

Následne bol skúmaný efekt stacionárnej fázy na neutrálnej kolóne XBridge BEH Amide a kolónach Avantor ACE HILIC-A a Sequant ZIC-HILIC s iónovými interakciami. Mobilné fázy obsahovali vysoký podiel acetonitrilu (70–90 %) a ich zloženie bolo nasledovné – 25 mM octovej kyseliny v zmesi acetonitrilu a vody. Ďalej sa skúmal efekt zmeny koncentrácie aditíva mobilnej fázy (octová kyselina) na retenčné správanie analytov, a to na kolónach XBridge BEH Amide a Sequant ZIC-HILIC. Druhá zmienaná kolóna bola následne využitá pre skúmanie vplyvu zmeny pH na retenciu analytov. Na kolóne Avantor ACE HILIC-A bol rovnako skúmaný vplyv zmeny pH.

Najlepšia separácia a rozlíšenie všetkých píkovo pri dĺžke analýzy 20 minút bolo dosiahnuté na kolóne Sequant ZIC-HILIC s mobilnou fázou pozostávajúcou z 25 mM kyseliny octovej v zmesi acetonitril:voda v pomere 80:20. Avšak v priebehu meraní dochádzalo k nestabilite v retencii katecholamínov, ktorú sa nepodarilo odstrániť regeneráciou kolóny, rozličnou prípravou mobilnej fázy a ani predĺžením času premytia kolóny.

**Kľúčové slová:** HPLC, HILIC, katecholamíny, tyrozín

## **Abstract**

**Charles University**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

**Candidate:** Andrej Tibenský

**Supervisor:** PharmDr. Petr Kastner, Ph.D.

**Title of thesis:** Retention behaviour of catecholamines and their precursors under HILIC conditions

The aim of this diploma thesis was to study retention behaviour of catecholamines and their precursors under Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography by using spectrophotometric and fluorometric detection. 5 analytes were examined – adrenaline, noradrenaline, dopamine, L-DOPA, and tyrosine. Retention behaviour studying began by using LUNA 3  $\mu\text{m}$  (PFP)<sub>2</sub> column which possesses both RPLC and HILIC characteristics with 2 different mobile phases. The first one consisted of 25 mM acetic acid in mixture of acetonitrile and water and the second mobile phase was 25 mM acetate buffer (pH 4,50) in mixture of acetonitrile and water.

Subsequently, the effect of stationary phase was studied on neutral column XBridge BEH Amide and columns Avantor ACE HILIC-A and Sequant ZIC-HILIC with ionic interactions. Mobile phases consisted of high proportion of acetonitrile (70–90 %) and their composition was the following – 25 mM acetic acid in mixture of acetonitrile and water. Then, the effect of acetic acid concentration as a mobile phase additive on retention behaviour of analytes was studied on XBridge BEH Amide and Sequant ZIC-HILIC columns. Also, the effect of pH and mobile phase composition was studied by using Sequant ZIC-HILIC column and Avantor ACE HILIC-A (only effect of pH).

The best separation and baseline resolution of all peaks within 20 minutes was achieved with Sequant ZIC-HILIC column with the mobile phase 25 mM acetic acid in mixture of acetonitrile:water (80:20). However, instability in retention time was noticed and it could not be removed even by column regeneration, different mobile phase preparation strategies or prolongation of equilibration time.

**Keywords:** HPLC, HILIC, catecholamines, tyrosine

# OBSAH

<b>1. Úvod</b> .....	<b>8</b>
<b>2. Cieľ práce</b> .....	<b>9</b>
<b>3. Teoretická časť</b> .....	<b>10</b>
3.1. Katecholamíny a ich prekursorzy .....	10
3.1.1. Adrenalín.....	10
3.1.2. Noradrenalín .....	11
3.1.3. Dopamín.....	11
3.1.4. Levodopa.....	12
3.1.5. Tyrozín.....	12
3.2. Fyzikálne-chemické vlastnosti katecholamínov a ich prekursorov .....	13
3.3. Biosyntéza a degradácia katecholamínov .....	14
3.3.1. Biosyntéza katecholamínov .....	14
3.3.2. Degradácia katecholamínov .....	15
3.4. Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia.....	15
3.4.1. Charakteristika HPLC .....	15
3.4.2. Princíp separácie HPLC .....	16
3.4.3. Inštrumentácia kvapalinového chromatografu.....	16
3.4.4. Separáčné módy .....	19
3.4.5. Stacionárne fázy .....	21
3.4.6. Detektory.....	23
3.4.7. Vybrané základné chromatografické parametre .....	26
3.5. Štúdie pre stanovenie katecholamínov v HILIC podmienkach.....	28
<b>4. Metodická časť</b> .....	<b>33</b>
4.1. Chemikálie, inštrumentácia, prístroje, laboratórne pomôcky .....	33
4.1.1. Chemikálie .....	33
4.1.2. Inštrumentácia.....	33

4.1.3.	Prístroje a laboratórne pomôcky.....	34
4.2.	Obecné postupy.....	34
4.2.1.	Príprava MF.....	34
4.2.2.	Príprava štandardných roztokov .....	35
4.3.	Popis experimentálnej práce .....	36
<b>5.</b>	<b>Experimentálna časť a diskusia.....</b>	<b>37</b>
5.1.	Reverzný mód vs. HILIC mód.....	37
5.1.1.	LUNA 3 µm PFP(2) .....	37
5.1.1.1.	Vplyv % organického rozpúšťadla.....	37
5.1.1.2.	Vplyv pH.....	38
5.2.	HILIC mód.....	39
5.2.1.	Vplyv chémie stacionárnej fázy .....	40
5.2.1.1.	Neutrálne stacionárne fázy.....	40
5.2.1.2.	Stacionárne fázy s iónovými skupinami .....	40
5.2.1.3.	Súhrn .....	42
5.2.2.	Vplyv zloženia a pH mobilnej fázy .....	43
5.2.2.1.	Sequant ZIC-HILIC kolóna .....	43
5.2.2.2.	Avantor ACE HILIC-A kolóna.....	44
5.2.3.	Vplyv koncentrácie aditíva mobilnej fázy.....	44
5.2.3.1.	XBridge BEH Amide kolóna .....	44
5.2.3.2.	Sequant ZIC-HILIC kolóna .....	45
5.3.	Komplexnosť ZIC-HILIC .....	46
5.3.1.	Nestabilita retencie .....	46
<b>6.</b>	<b>Záver.....</b>	<b>47</b>
<b>7.</b>	<b>Zoznam použitých skratiek .....</b>	<b>49</b>
<b>8.</b>	<b>Zoznam použitej literatúry.....</b>	<b>51</b>

# 1. Úvod

Táto diplomová práca je súčasťou projektu Grantovej agentúry UK (GAUK) č. 349 521 s názvom „Komplexní vývoj separační metody pro výzkum katecholaminů v placentě“ zaoberajúceho sa vývojom chromatografickej metódy pre stanovenie tyrozínu a jeho významných metabolitov, ktorý prebieha v spolupráci s Katedrou farmakologie a toxikologie na Farmaceutickej fakulte Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Ako už prezrádza samotný názov diplomovej práce, tak predmetom výskumu boli katecholamíny – adrenalín, noradrenalín a dopamín, spolu s ich prekurzormi L-DOPA a tyrozínom. Katecholamíny, produkované najmä dreňou nadobličiek, zohrávajú významnú úlohu v ľudskom organizme vo forme neurotransmiterov a hormónov, čím zabezpečujú množstvo fyziologických procesov. Ich nedostatok alebo naopak nadbytok je príčinou rady neurodegeneratívnych, nádorových či kardiovaskulárnych ochorení, akými sú napríklad feochromocytóm, neuroblastóm, hypertenzia alebo aj riziko vyvolania predčasného pôvodu. Z vyššie uvedeného preto vyplýva potreba vývoja analytickej metódy pre stanovenie týchto látok, ktorú by spolupracujúca Katedra farmakologie a toxikologie skúmajúca vplyv katecholamínov tvoriacich sa v placentе na vývoj plodu mohla využiť pre zhodnotenie významu katecholamínov na plod.

Teoretická časť diplomovej práce sa venuje popisu katecholamínov a ich prekurzorov, konkrétne ich funkciám, metabolizmu a fyzikálne-chemickým vlastnostiam. Ďalej sa v nej popisujú základné informácie o vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografii a súhrn publikačných poznatkov o separácii katecholamínov pomocou kvapalinovej chromatografie so separačným módom HILIC, ktorý je v experimentálnej časti využívaný.

V experimentálnej časti diplomovej práce sú následne popísané výsledky jednotlivých meraní – retenčné správanie katecholamínov a ich prekurzorov v rôznych HILIC podmienkach.



## **2. Cieľ práce**

Cieľom tejto diplomovej práce je popísanie retenčných vlastností katecholamínov (adrenalín, noradrenalín, dopamín) a ich prekurzorov (L-DOPA, tyrozín) v rôznych HILIC podmienkach za použitia spektrofotometrickej a fluorimetrickej detekcie. Skúmaný bude vplyv chémie stacionárnej fáze, vplyv zloženia a pH mobilnej fáze a vplyv koncentrácie aditíva na retenciu vyššie spomenutých analytov.

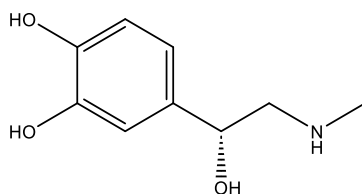
Sekundárnym cieľom je separácia všetkých skúmaných analytov pomocou vhodnej chromatografickej metódy.

### 3. Teoretická časť

#### 3.1. Katecholamíny a ich prekurzory

Katecholamíny sú látky odvodené od aminokyseliny tyrozínu vyznačujúce sa prítomnosťou benzénového kruhu s 2 susediacimi hydroxylovými skupinami a postranným reťazcom s aminoskupinou vo svojej chemickej štruktúre. Do tejto skupiny látok patria neselektívne sympatomimetiká adrenalín (A), noradrenalín (NA) a dopamín (D), ktoré v ľudskom organizme plnia úlohu neurotransmiterov (A, NA, D) a hormónov (A, NA). [1, 2]

##### 3.1.1. Adrenalín



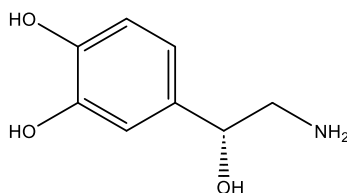
Obrázok 1: Štruktúrny vzorec adrenalínu vytvorený v programe ChemDraw.

Adrenalín, známy tiež pod názvom epinefrín, je látka so systematickým názvom (1R)-1-(3,4-dihydroxyfenyl)-2-(metylamo)etán-1-ol a sumárnym vzorcom C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>. Jedná sa o biely alebo takmer biely kryštalický prášok meniaci zafarbenie na vzduchu a svetle. Je prakticky nerozpustný vo vode, 96% etanole a dichlórmetáne. Rozpúšťa sa v kyseline chlorovodíkovej. [3]

Tento endogénny katecholamín plní predovšetkým funkciu stresového hormónu nadobličiek a neurotransmiteru v CNS. V menšej miere sa môže uplatniť aj ako neurotransmitter v PNS. Stimuluje najmä  $\alpha_1$ -receptory a  $\beta_1$ -receptory, v menších dávkach však stimuluje aj  $\beta_2$ -receptory. V dôsledku stimulácie týchto receptorov dochádza k pôsobeniu na myokard (pozitívne chronotropný, batmotropný, inotropný a dromotropný efekt), priedušky (bronchodilatácia), cievy (vazokonstrikcia –  $\alpha_1$ , vazodilatácia –  $\beta_2$ ) či tráviaci trakt (zníženie motility a sekrécie). [4, 5]

Využitie adrenalínu nachádza pri zástave srdca (súčasť kardiopulmonálnej resuscitácie), anafylaktickom šoku či ako vazokonstrikčná prísada lokálnych anestetík (prevencia krvácania). [4, 5]

### 3.1.2. Noradrenalín



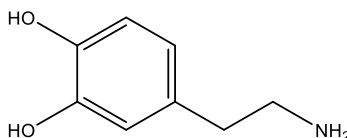
*Obrázok 2: Štruktúrny vzorec noradrenalínu vytvorený v programe ChemDraw.*

Noradrenalín, známy tiež pod názvom norepinefrín, je látka so systematickým názvom (1*R*)-2-amino-1-(3,4-dihydroxyfenyl)etán-1-ol a sumárnym vzorcom  $C_8H_{11}NO_3$ . Jedná sa o biely alebo hnedobiely kryštalický prášok, ktorý je veľmi ľahko rozpustný vo vode a ťažko rozpustný v 96% etanole. Pôsobením vzduchu a svetla sa zafarbuje. [3]

Rovnako ako adrenalín, tak aj noradrenalín je produkovaný v dreni nadobličiek. V organizme plní rolu hlavného neurotransmiteru sympatiku. Na rozdiel od adrenalínu tu však absentuje stimulácia  $\beta_2$ -receptorov. [4, 5]

Vzhľadom k svojmu významnému efektu na cievy (zvýšenie periférneho cievneho odporu) sa noradrenalín uplatňuje ako periférne analeptikum pri šokových stavoch a stavoch hypotenzie – je to liek prvej voľby. [4, 5]

### 3.1.3. Dopamín

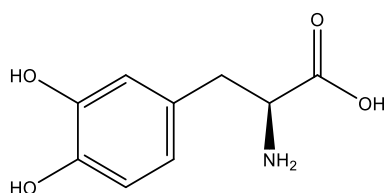


*Obrázok 3: Štruktúrny vzorec dopamínu vytvorený v programe ChemDraw.*

Dopamín je látka so systematickým názvom 4-(2-aminoetyl)benzén-1,2-diol a sumárnym vzorcom  $C_8H_{11}NO_2$ . Je to biely alebo takmer biely kryštalický prášok. Dopamín je ľahko rozpustný vo vode, dobre rozpustný v 96% etanole, mierne rozpustný v acetóne a v dichlórmetáne. [3]

Jedná sa o neurotransmitter v CNS (stimulácia  $D_1$  a  $D_2$ -receptorov), pôsobí však aj na  $\alpha$ -receptory a  $\beta$ -receptory. Dopamín je okrem iného aj prekurzorom adrenalínu a noradrenalínu. Terapeutické využitie dopamínu je nasledovné – liečba šokových stavov a patologických stavov charakteristických ťažkou hypotenziou. [4, 5]

### 3.1.4. Levodopa

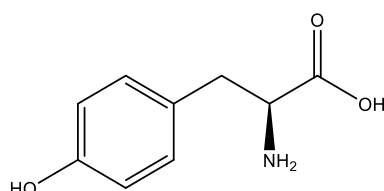


Obrázok 4: Štruktúrny vzorec levodopy vytvorený v programe ChemDraw.

Levodopa, známa tiež ako L-DOPA, je látka so systematickým názvom kyselina (2*S*)-2-amino-3-(3,4-dihydroxyfenyl)propánová a sumárnym vzorcom C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>. Jedná sa o biely alebo takmer biely kryštalický prášok. L-DOPA je ťažko rozpustná vo vode, prakticky nerozpustná v 96% etanole, ľahko rozpustná v kyseline chlorovodíkovej 1 mol/l RS a mierne rozpustná v kyseline chlorovodíkovej 0,1 mol/l RS. [3]

Táto látka je prekursorom dopamínu a terapeuticky sa využíva v terapii Parkinsonovej choroby. Nakoľko sa veľké množstvo levodopy konvertuje na dopamín už v periférnych tkanivách, podáva sa toto liečivo v kombinácii s karbidopou alebo benserazidom – inhibítormi DOPA-dekarboxylázy. [4, 5]

### 3.1.5. Tyrozín



Obrázok 5: Štruktúrny vzorec tyrozínu vytvorený v programe ChemDraw.

Tyrozín je chemická látka nesúca nasledovný systematický názov: kyselina (2*S*)-2-amino-3-(4-hydroxyfenyl)propánová. Je to biely alebo takmer biely kryštalický prášok alebo bezfarebné kryštály. Tyrozín je veľmi ťažko rozpustný vo vode, prakticky nerozpustný v 96% etanole. Rozpúšťa sa v zriedených minerálnych kyselinách a v zriedených roztokoch alkalických hydroxidov. [3]

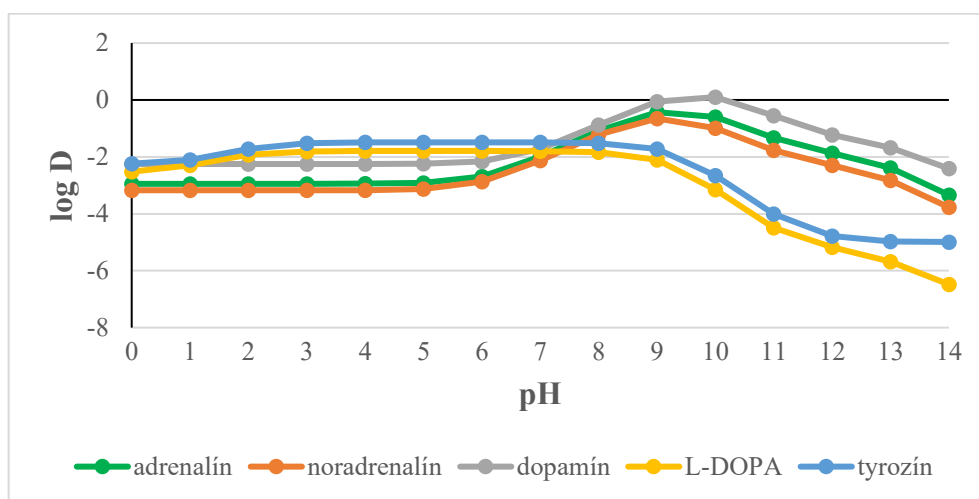
Jedná sa o neesenciálnu aminokyselinu, ktorá vzniká hydroxyláciou fenylalanínu. Tyrozín je prekursorom catecholamínov a hormónov štítnej žľazy, základnou zložkou melanínu a stavebnou jednotkou proteínov. [2]

### 3.2. Fyzikálne-chemické vlastnosti katecholamínov a ich prekursorov

*Tabuľka 1: Vybrané fyzikálne-chemické vlastnosti katecholamínov a ich prekursorov. Hodnoty log P boli získané, resp. vypočítané pomocou programov ChemDraw a Chemaxon. Pre získanie ostatných fyzikálne-chemických vlastností bol použitý program ChemDraw.*

	Mr (g/mol)	pKa	log P
<b>adrenalín</b>	183,2072	8,589; 15,075; 9,923; 16,461	0,28 (ChemDraw) -0,44 (Chemaxon)
<b>noradrenalín</b>	169,1803	16,428; 15,102; 8,542; 10,001	-0,24 (ChemDraw) -0,62 (Chemaxon)
<b>dopamín</b>	153,1809	15,251; 8,727; 10,674	0,58 (ChemDraw) 0,10 (Chemaxon)
<b>L-DOPA</b>	197,1907	2,123; 14,935; 8,699; 10,579	0 (ChemDraw) -2,24 (Chemaxon)
<b>tyrozín</b>	181,1913	2,023; 9,346; 10,670	0,39 (ChemDraw) -1,96 (Chemaxon)

Nakoľko sa jedná o látky, ktoré je možné ionizovať, tak vyššiu výpovednú hodnotu z hľadiska distribúcie analytov medzi organickú a vodnú zložku než logaritmovaná hodnota rozdeľovacieho koeficientu (log P) má logaritmovaná hodnota distribučného koeficientu (log D), ktorá je závislá na hodnote pH. Hodnoty log D katecholamínov a ich prekursorov sú uvedené v grafe 1:



*Graf 1: Hodnoty log D katecholamínov a ich prekursorov v pH rozpätí 1-14. Hodnoty pre zostrojenie grafu boli vypočítané pomocou programu Chemaxon.*

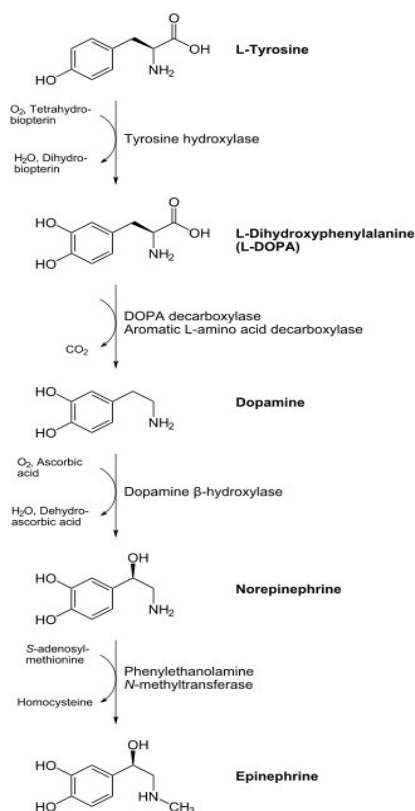
### 3.3. Biosyntéza a degradácia katecholamínov

Katecholamíny sú látky odvodené od tyrozínu, aromatickej aminokyseliny. Radíme sem adrenalín, noradrenalín a dopamín, ktoré sú produkované chromafínnymi bunkami. [1, 2, 8] Nasledujúca kapitola pojednáva ich biosyntézu a degradáciu v organizme.

#### 3.3.1. Biosyntéza katecholamínov

Biosyntéza prebieha v chromatófínných bunkách nachádzajúcich sa v rôznych častiach ľudského tela – dreň nadobličiek, adrenergne neuróny postgangliového sympatiku, centrálny nervový systém, srdce, pečeň či pohlavné žľazy. [6, 8]

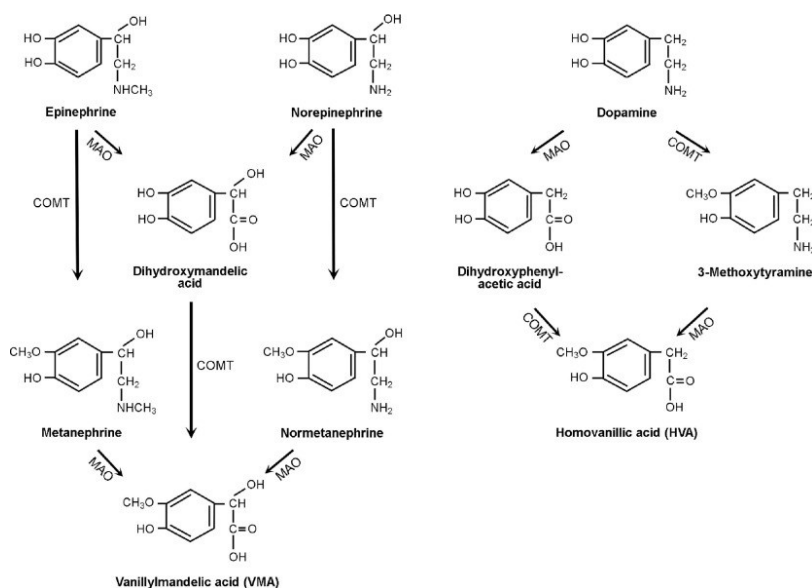
Východiskovým substrátom biosyntézy katecholamínov je aminokyselina tyrozín. Pôsobením enzýmu tyrozínhydroxyláza, ktorý je zároveň limitujúcim enzýmom celej biosyntézy, dochádza k tvorbe L-dihydroxyfenylalanínu (L-DOPA) – látke s pyrokatecholovou štruktúrou, ktorá je charakteristická pre katecholamíny. Konvertovanie L-DOPA na dopamín prebieha pomocou enzýmu DOPA-dekarboxyláza. Následnou hydroxyláciou dopamínu za pôsobenia enzýmu dopamín- $\beta$ -hydroxyláza vzniká noradrenalín. Posledným krokom biosyntézy je vznik adrenalínu z noradrenalínu pôsobením enzýmu fenyletanolamín-N-metyltransferáza. [6, 7, 8]



Obrázok 6: Schéma biosyntézy katecholamínov. [9]

### 3.3.2. Degradácia katecholamínov

Katecholamíny sú látky charakteristické krátkym biologickým polčasom (jednotky minút). K ich enzymatickej inaktivácii a degradácii dochádza pomocou 2 degradačných enzýmov – katechol-O-metyltransferáza (COMT) a monoaminoxidáza (MAO). Hlavným degradačným produktom nadobličkových hormónov, adrenalínu a noradrenalínu, je vanilmandľová kyselina (VMA). V prípade dopamínu to je homovanilová kyselina (HVA). [4, 6, 7, 8]



Obrázok 7: Schéma degradácie katecholamínov. [10]

## 3.4. Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

### 3.4.1. Charakteristika HPLC

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (angl. High-Performance Liquid Chromatography = HPLC) je separačná analytická metóda umožňujúca kvalitatívne a kvantitatívne hodnotenie separovaných zložiek zmesi. [11]

Jej počiatky siahajú do 20. storočia, kedy bola chromatografia v roku 1903 objavená botanikom M. S. Tswetom. O zrod kvapalinovej chromatografie ako ju poznáme dnes sa však zaslúžil profesor C. Horváth v 60. rokoch 20. storočia vytvorením stacionárnej fázy vhodnej pre kvapalinovú chromatografiu a zostrojením prvého kvapalinového chromatografu. [12]

Táto separačná metóda patrí v súčasnosti k najpoužívanejším analytickým metódam. V modernom farmaceutickom priemysle nachádza HPLC uplatnenie a je dôležitou súčasťou všetkých fáz objavovania, vývoja a produkcie liečivých látok. Vysokoučinná kvapalinová chromatografia sa teší veľkej obľube vďaka svojej univerzálnosti, citlivosti, rýchlosti a selektivite analýzy. Ďalšou výhodou je aj fakt, že analýzu možno vykonať aj s malým množstvom vzorky. [11, 12]

### **3.4.2. Princíp separácie HPLC**

Separácia zmesi látok pomocou vysokoučinnnej kvapalinovej chromatografie je založená na princípe rozdielnej distribúcie látok medzi častice stacionárnej fázy a mobilnej fázy. [11, 12, 13]

Zmes látok je na kolónu privádzaná mobilnou fázou a jej distribúcia je daná vplyvom interakcií látok so stacionárnou fázou a mobilnou fázou – čím má daný analyt silnejšiu afinitu k stacionárnej fáze, tým dlhšie je na kolóne zadržovaný a naopak. V prípade, že každá z látok zmesi má odlišnú afinitu k stacionárnej fáze, sú látky vymyté z kolóny v odlišnom čase a dochádza tak k separácii zmesi. [12, 13]

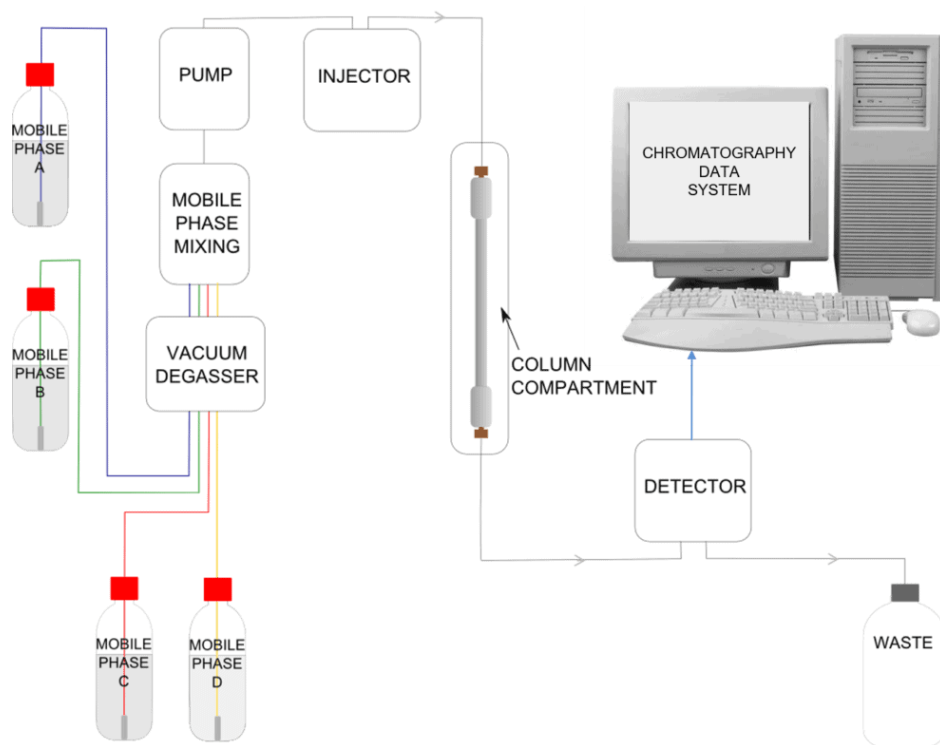
Po vymytí z kolóny sú jednotlivé látky detegované príslušným detektorom. Ten prenáša signál do HPLC softvéru, ktorý na konci analýzy poskytne odozvu v podobe chromatogramu obsahujúceho krivky jednotlivých látok, ktoré sa nazývajú píky a poskytujú dáta potrebné k vyhodnoteniu kvalitatívnej a kvantitatívnej analýzy. [12, 13]

### **3.4.3. Inštrumentácia kvapalinového chromatografu**

Typická HPLC zostava, ktorej schéma je zobrazená na obrázku 8, pozostáva z nasledujúcich komponentov:

- zásobník mobilnej fázy
- odplyňovač (degasser)
- vysokotlakové čerpadlo (pumpa)
- zmiešavač mobilnej fázy
- dávkovač vzoriek (autosampler)
- chromatografická kolóna v termostatovanom priestore
- detektor
- softvér pre vyhodnotenie dát [14]





*Obrázok 8: Schéma kvapalinového chromatografu. [15]*

### **Zásobníky MF**

Zásobníky MF sú určené pre uskladnenie dostatočného množstva MF, aby mohla analýza, resp. sled analýz prebiehať bez prerušenia. Najčastejšie sa využívajú hrubostenné sklenené fľaše, ktoré sa odporúčajú byť v priebehu meraní uzavreté pri využívaní prchavých látok, aby sa predišlo nežiaducemu odpareniu a následnej zmene pomerov jednotlivých zložiek MF. Ešte pred vstupom do chromatografického systému prechádza MF cez fritu, aby sa zamedzilo prestupu väčších pevných častíc do púmp. [13]

### **Odplyňovač**

Odplyňovač (angl. degasser) je obvyklou súčasťou väčšiny chromatografov za účelom eliminácie rozpustených plynov v MF. Použitím tohto komponentu sa tak zamedzí možnosti tvorby bublín v pumpách či detektore. [13]

### **Vysokotlakové čerpadlo**

Úlohou vysokotlakového čerpadla je zabezpečiť konštantný a kontinuálny prietok MF chromatografickým systémom, ktorého sa dosahuje pomocou vysokého tlaku. K dôležitým vlastnostiam púmp taktiež patrí minimálne kolísanie tlaku (minimum pulzácií) a presnosť (schopnosť pumpy udržať nastavený prietok). [13]

### **Zmiešavač mobilnej fázy**

Automatické zmiešanie MF sa využíva najmä pri gradientovej elúcii, ale možno ho využiť aj pri izokraticej elúcii. Rozlišujeme vysokotlakové a nízkotlakové zmiešanie. V prvom prípade má vodná aj organická zložka MF vlastnú pumpu a k ich zmiešaniam dochádza až v priestore za pumpami, kde je vysoký tlak. V prípade nízkotlakového zmiešania sa využíva k prívodu MF do systému jedna pumpa a zmiešanie zložiek MF nastáva pred vstupom do vysokotlakového čerpadla. [13]

### **Dávkovač vzoriek**

Táto časť chromatografu je zodpovedná za nástrek vzoriek do toku MF ešte pred tým, než príde do kolónového priestoru. V dnešnej dobe sa v drvivej väčšine kvapalinových chromatografov využíva autosampler, ktorý automaticky vykoná nástrek konkrétnej vzorky zo zásobníka vzoriek v stanovenom objeme podľa nastavenia užívateľa. Vzorky sú v zásobníku uložené vo vialkách s objemom 1–2 ml, uzavreté viečkom so septom. [13]

### **Chromatografická kolóna v termostatovanom priestore**

Kolóna sa niekedy označuje aj ako „srdce HPLC systému“ – prebieha tu totiž samotný proces separácie analytov. Jedná sa o nerezovú trubicu s dĺžkou 100–250 mm a vnútorným priemerom 3–5 mm, ktorá je naplnená je sorbentom – stacionárnou fázou. Rôzne druhy stacionárnych fáz budú bližšie predstavené v podkapitole 3.4.5. [11, 12, 13]

V chromatografickom systéme je kolóna uložená v termostatovanom priestore, v ktorom je udržiavaná konštantná teplota, nakoľko aj malý výkyv teploty kolóny môže ovplyvniť výsledok analýzy. [13]

### **Detektor**

Detektor je tou časťou chromatografu, ktorý zodpovedá za detekciu analytov pri výstupe z kolóny. Spôsob detekcie je charakterizovaný typom použitého detektoru. Typom detektorov je venovaná samostatná podkapitola 3.4.6. Po detekcii v detektore odteká MF s analytmi do nádoby na odpad. [13]

### **Softvér pre vyhodnocovanie dát**

Jedná sa o počítačovú aplikáciu, ktorá zbiera dáta z detektorov a pomocou ktorej môže užívateľ kontrolovať výkon kvapalinového chromatografu, upravovať chromatografické podmienky analýz a spracovávať namerané dáta. [12]

### 3.4.4. Separáčné módy

Separáčné módy využívané v analýzach pomocou kvapalinovej chromatografie sú dané charakterom SF, MF a typom interakcii s analytmi. [12] Táto podkapitola pojednáva vybrané základné separáčné módy kvapalinovej chromatografie.

#### **Chromatografia na normálnych fázach (NP-LC)**

Chromatografia na normálnych fázach, z angl. Normal-Phase Liquid Chromatography je najstarším separačným módom. Stacionárna fáza typická pre tento separačný mód je polárna a tvorená čistým silikagélom alebo silikagélom modifikovaným polárnou funkčnou skupinou, napr. amidovou, diolovou alebo kyanoskupinou. Mobilná fáza sa skladá z nepolárneho rozpúšťadla (hexán, heptán, chloroform, dichlórmetán) alebo ich zmesi. Možný je tiež prídavok malého množstva modifikátora polarita MF v podobe metanolu alebo etanolu pre kontrolu retencie analytov. Retenčný mechanizmus je založený na polárnych interakciách a preto platí, že čím je analyt polárnejší, tým má vyššiu retenciu, nakoľko silnejšie interaguje so SF. Zároveň však retencia analytov klesá s rastúcou polaritou MF. [12]

NP-LC separačný mód nachádza uplatnenie v analýze látok náchylných na hydrolýzu, silno hydrofóbných látok a uhlíkov. Rovnako tiež slúži na separáciu izomérov či nasýtených/nenasýtených látok. Avšak s vývojom ďalších separačných módov sa stáva čoraz viac obsolentným a menej využívaným. [12]

#### **Chromatografia na reverzných fázach (RP-LC)**

V súčasnosti najvyužívanejším separačným módom HPLC je chromatografia na reverzných fázach, z angl. Reversed-Phase Liquid Chromatography. Ako už samotný názov napovedá, tak polarita oboch fáz je opačná ako v NP-LC: MF je polárna a SF je hydrofóbná. MF je tvorená organickou zložkou (napr. metanol, acetonitril, tetrahydrofurán) a vodnou zložkou (roztok kyseliny alebo pufru), SF má najčastejšie charakter silikagélu modifikovaného dlhými hydrofóbnymi reťazcami (napr. C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>, C<sub>30</sub>). Hovoriac o retenčnom mechanizme, tak v prípade RP-LC možno hovoriť o dominantnom vplyve hydrofóbných interakcii, primárne van der Waalsových síl. Rovnako ako polarita fáz, tak aj poradie retencie je v RP-LC opačné. Platí preto, že na kolóne sú viac zadržované menej polárne analyty a s rastúcou polaritou MF retencia rastie. [12]

RP-LC je možné uplatniť v separácii katecholamínov a ich prekursorov napriek skutočnosti, že sa jedná o polárne a iónové látky, ktoré v RP-LC majú veľmi nízku retenciu. [16, 17, 18, 19] Zvýšenia retencie a zníženia polarite látok je možné docieľiť pomocou úpravy pH MF, ktoré hrá rolu v ionizácii funkčných skupín a polarite látok. [12]

### **Chromatografia hydrofilných interakcii (HILIC)**

Chromatografia hydrofilných interakcii, z angl. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, je separačný mód často označujúci sa ako „alternatíva k NP-LC“. SF je polárna rovnako ako v NP-LC a pozostáva buď z čistého silikagélu, alebo silikagélu modifikovaného polárnymi funkčnými skupinami (napr. aminoskupina, aminopropyllová skupina, amidová skupina, kyanoskupina, diolová skupina, sulfoalkylbetainová skupina). Na druhej strane zloženie MF je podobné tomu v RP-LC – vysoký podiel aprotického rozpúšťadla miešateľného s vodou (najčastejšie ACN) a malý podiel vody (5–40 %) s prídavkom aditíva v podobe kyseliny alebo pufru. [14, 20]

Separácia látok v HILIC móde je daná komplexným retenčným mechanizmom na rozdiel od NP-LC, kde je retenčný mechanizmus založený iba na hydrofilných interakciách. Najväčší podiel na tomto komplexnom retenčnom mechanizme hrá „partitioning“. Súčasná teória hovorí, že v HILIC podmienkach sa vytvorí tzv. pseudostacionárna fáza tvorená vodnou vrstvou na povrchu SF a MF bohatá na organické rozpúšťadla, čím vzniká extrakčný systém kvapalina/kvapalina a analyty sú po nástreku na kolónu rozdeľované medzi tieto 2 fázy. Na retencii látok sa okrem iného podieľajú aj iónové a hydrofóbne interakcie. [14, 20]

Separatívny mód HILIC sa v dnešnej dobe teší čoraz väčšej obľube a svoje uplatnenie nachádza v separácii polárnych a iónových látok (napr. tetracyklíny, uhl'ovodíky, glykopeptidy, aminokyseliny, proteíny), akými sú aj katecholamíny a ich prekursori, ktoré sú predmetom záujmu tejto DP. [14, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28]

### **Iónová (iónomeničová) chromatografia (IEX)**

Separatívny mód s názvom iónová chromatografia, z angl. Ion-Exchange Chromatography, je založený na princípe rozličných afínit nabitých skupín analytov k opačne nabitým iónom SF. Pre IEX je charakteristická SF s obsahom iónovej alebo ionizovateľnej skupiny, tzv. ionex, ktorý nesie opačný náboj ako analyzovaná látka. Rozlišujeme 2 typy ionexov: katex nesúci negatívny náboj (napr. sulfónová skupina)

a anex nesúci pozitívny náboj (napr. amónna skupina). Súčasťou MF sú ióny nesúce rovnaký náboj ako analyt – nazývajú sa protiióny. Retenčný mechanizmus IEX spočíva vo vytesňovaní analytov a protiiónov z ionexu SF. [12, 14]

Nakoľko katecholamíny a tyrozín s L-DOPA obsahujú ionizovateľnú aminoskupinu, tak je možné tieto látky analyzovať aj týmto separačným módom, konkrétne za pomoci SF obsahujúcej katex. [29, 30]

### **Chirálna chromatografia**

Ako už vyplýva z názvu, chirálna chromatografia je určená pre látky obsahujúce chirálne centrum – existujúce v 2 enantiomérnych formách. Z dôvodu, že enantioméry zdieľajú rovnaké fyzikálne-chemické vlastnosti, nie je možné ich tak jednoducho separovať. Keďže sa však účinok jednotlivých stereoizomérnych foriem môže značne líšiť, tak je nutná ich separácia pre kvantitatívne určenie v zmesi. Separáciu možno doceliť buď priamym, alebo nepriamym prístupom. Nepriamy prístup spočíva v derivatizácii enantiomérov v prítomnosti opticky aktívneho činidla za vzniku diastereoizomérov, ktoré umožňujú separáciu. Priamy prístup je založený na zavedení chiralít do chromatografického systému – do MF (pridaním chirálneho činidla) alebo SF (napr. polymérne SF alebo SF na báze cyklodextrínov). [14, 31]

S výnimkou dopamínu všetky skúmané látky v rámci tejto DP obsahujú chirálne centrum, čo umožňuje separáciu daných izomérnych foriem. [32, 33]

#### **3.4.5. Stacionárne fázy**

Stacionárna fáza je náplň kolóny, na ktorej dochádza k separácii analytov. Sorbent je stavebnou jednotkou náplne kolóny a podľa jeho charakteru rozlišujeme náplňové a monolitické kolóny. [12, 14]

Náplňové kolóny obsahujú malé, guľaté častice pokryté pórmí. Vďaka týmto pórom nadobúda SF veľký povrch umožňujúci separáciu. Podľa tvaru rozlišujeme porézne, pelikulárne, perfúzne častice a častice s pevným jadrom. Na druhej strane monolitické kolóny sa skladajú z 1 kusu sorbentu obsahujúceho 2 druhy pórov – makropóry zodpovedné za transport MF cez sorbent a mezopóry zabezpečujúce separáciu. [12, 14]

Dôležitými vlastnosťami každej kvalitnej SF sú mechanická a chemická stabilita. Materiálov pre výrobu sorbentu SF je niekoľko a z tohto dôvodu bude zvyšok tejto podkapitoly venovaný práve im. [12, 14]

## **Silikagél**

V dnešnej dobe je to najvyužívanejší materiál na výrobu SF. Jedná sa o polárny anorganický sorbent, ktorý je možné vyrobiť polykondenzáciou tetraetoxysilanových molekúl alebo pomocou koloidného procesu sól-gél. Povrch silikagélového sorbentu tvoria silanolové skupiny, ktoré je možné modifikovať pomocou rôznych hydrofóbných alebo hydrofilných funkčných skupín v závislosti od toho, pre ktorý separačný mód je kolóna určená. [12, 14]

Nevýhodou tohto materiálu je jeho nestabilita pri vyššom pH (rozpustnosť vo vode) a vyššej teplote (nad 60 °C) a taktiež veľké množstvo voľných silanolových skupín na povrchu. [12, 14]

## **Silikagelový hybrid**

Tento druh materiálu rieši už vyššie zmienené nevýhody čistého silikagélu. Rozdiel spočíva v pridaní metyltrietyloxysilanových molekúl do syntézy, čím sa docieli zníženie počtu silanolových skupín na povrchu SF – určitá časť je nahradená metylovými skupinami (pomer je daný množstevným pomerom reaktantov). Vďaka tejto úprave sa okrem zníženia množstva silanolových skupín zvýši aj stabilita pri vyššom pH. [12]

## **Polymér**

V prípade SF na báze polyméru sa najčastejšie využíva zosieťovaný kopolymér divinylbenzénu a polystyrénu. Polymérne kolóny sa vyznačujú lepšou stabilitou pri vysokom pH, avšak trpia na nižšiu účinnosť separácie v porovnaní s kolónami na báze silikagélu. [12, 14]

## **Oxidy kovov**

Oxidy kovov sú ďalším typom materiálu pre výrobu SF – najviac využívaným je oxid zirkoničitý, menej sa využíva oxid hlinitý, prípadne oxid titaničitý. Výhodnými vlastnosťami takýchto kolón sú ich vysoká fyzikálna aj chemická odolnosť. Na druhej strane však obťažnosť a komplikovanosť chemickej modifikácie ich povrchu je hlavnou nevýhodou. [12, 14]

### **Porézny grafitizovaný uhlík**

Z chemického hľadiska v prípade tohto druh sorbentu SF hovoríme o poréznom grafitizovanom uhlíku, ktorý sa skladá z vrstiev hexagonálne usporiadaných atómov uhlíka v množstve asi  $10^5$  atómov v jednej vrstve. Vyznačuje sa chemickou stabilitou v celom pH rozmedzí a teplotnou stabilitou do 200 °C, avšak aj nižšou účinnosťou separácie v porovnaní s konvenčným silikagélom. Využitie nachádza v separácii konformačných izomérov vďaka svojej planárnej štruktúre. [12, 14]

#### **3.4.6. Detektory**

Po separácii zmesi analytov na kolóne je potrebné daný proces separácie detegovať, na čo slúžia v kvapalinovej chromatografii detektory. V dnešnej dobe existuje hneď niekoľko druhov detektorov, ktoré pracujú na rôznych princípoch detekcie, čím si nachádzajú rôznorodé uplatnenie na poli analytických metód kvapalinovej chromatografie. K najdôležitejším vlastnostiam optimálneho detektora patria vysoká citlivosť, univerzálnosť, predvídateľná špecifickosť, vysoká rýchlosť odozvy, nedeštruktívnosť analytov a nezávislosť signálu od zloženia MF, zmeny teploty či rýchlosti prietoku. Do dnešného dňa však nie je dostupný žiaden detektor spĺňajúci všetky vyššie uvedené charakteristiky. [13, 14]

Katecholamíny a ich prekurzory je možné vďaka ich chemickým a fyzikálnym charakteristikám detegovať za použitia rôznych detektorov. Avšak kvôli ich nízkej koncentrácii v biologickom materiáli je nutná vysoko citlivá a špecifická detekcia. [34] Ďalej v tejto podkapitole budú rozobrané tie z nich, ktoré našli v analýze katecholamínov svoje využitie alebo boli využité pre účely tejto DP.

#### **Spektrofotometrické detektory (UV-VIS)**

Spektrofotometrické detektory patria k najrozšírenejším a najviac používaným detektorom. Aby bolo možné tento typ detektora v analýze využiť, tak je nevyhnutná schopnosť analytov absorbovať žiarenie v ultrafialovej alebo viditeľnej oblasti spektra. Ako zdroj žiarenia pre ultrafialovú oblasť slúži najčastejšie deutériová lampa, v prípade viditeľnej oblasti spektra je to volfrámová lampa. UV-VIS detektory možno využiť aj pre kvantitatívnu analýzu, kde pomocou Lambertov-Beerovho zákona je možné zistiť koncentráciu analytu vo vzorke. [13, 35]

UV-VIS detektory podľa konfigurácie delíme na detektory s fixnou vlnovou dĺžkou, detektory s nastaviteľnou vlnovou dĺžkou a detektory s diódovým polom. K hlavným výhodám spektrofotometrických detektorov patrí jednoduchosť, spoľahlivosť, kompatibilita s gradientovou elúciou a nedeštruktívnosť. Limitáciou však ostáva, že analyt musí obsahovať vo svojej štruktúre chromofór. [13, 35]

### **Fluorimetrické detektory (FD)**

Tento typ detektorov meria emisiu žiarenia analytov po ich predošlej excitácii pri vyššej vlnovej dĺžke. Zdrojom excitácie býva najčastejšie xenónová výbojka poskytujúca žiarenie v ultrafialovej a čiastočne aj vo viditeľnej časti spektra. Podmienkou pre vhodnosť použitia fluorimetrickej detekcie je schopnosť analytov vykazovať fluorescenciu – v prípade, že analyt danú vlastnosť nemá, je možné ho derivatizovať fluorescenčným činidlom. [13, 35]

V porovnaní s UV-VIS detektormi sú fluorimetrické detektory selektívnejšie a viac senzitívne. Z tohto dôvodu sa uplatňujú aj v analýzach katecholamínov a ich prekurzorov. Napriek tomu, že tieto analyty prirodzene vykazujú fluorescenciu, tak pre ich kvantitatívne stanovenie je potrebná derivatizácia. [13, 34, 35]

Ako vhodné derivatizačné činidlá sa podľa literatúry ukázali napríklad 9-fluorenylmetyloxykarbonyl chlorid (FMOC-Cl), 1,2-difenyletyléndiamín (DPE), benzylamín či etyléndiamín. [36, 37, 38, 39, 40, 41]

### **Elektrochemické detektory (ECD)**

Voľba elektrochemického detektora je vhodná v prípade analytov, ktoré je možné oxidovať alebo redukovať. Tento typ detektora pracuje na princípe 3 elektród (pracovná, pomocná, referenčná), ktoré zaznamenávajú elektródový potenciál/prúd pri prechode analytov prietokovou celou detektora. Pracovná elektróda, na ktorej prebieha elektrochemická reakcia, sa najčastejšie vyrába zo skleneného uhlíka a referenčná elektróda je argentochloridová. [13, 14, 35]

Podľa spôsobu merania elektrochemickej reakcie rozlišujeme ampérometrické detektory merajúce prúd vyvolaný prechodom analytu celou detektora a coulometrické detektory merajúce náboj potrebný k oxidácii/redukcii analytu. Výhodnými charakteristikami elektrochemických detektorov sú vysoká selektivita a senzitivita. Na druhej strane zanášanie elektród a ich pravidelné čistenie je mínusom. [13, 14, 35]



Z dôvodu, že katecholamíny a ich metabolity sú elektrochemicky aktívne látky (podliehajú oxidácii), tak môžu byť detegované aj elektrochemicky. Odborná literatúra uvádza vyššiu citlivosť a selektivitu za použitia coulometrických detektorov, avšak aj ampérometrické detektory sú vhodné pre analýzu týchto látok. [34, 42, 43, 44]

### **Detekcia pomocou hmotnostnej spektrometrie (MS)**

Spojenie kvapalinová chromatografia – hmotnostná spektrometria (LC-MS) je jednou z najpoužívanejších analytických techník súčasnosti, ktorá má široké uplatnenie na poli farmaceutickej analýzy – kvantitatívna aj kvalitatívna analýza biologických materiálov, stanovenie obsahu liečiv alebo určovanie nečistôt liečiv. LC-MS sa vyznačuje vysokou selektivitou a citlivosťou. [12, 31]

Detekcia pomocou MS spočíva v 3 krokoch. Prvým krokom je odstránenie nadbytočnej MF a ionizácia analytov pomocou vhodnej ionizačnej techniky – najčastejšie elektrosprejová ionizácia (ESI) alebo chemická ionizácia za atmosférického tlaku (APCI). Následne sú ióny privedené do analyzátoru, kde sa separujú podľa hmotnosti a náboja ( $m/z$ ). Posledným krokom je detekcia iónov pomocou detektora. Výsledkom hmotnostnej spektrometrie je hmotnostné spektrum. [11, 12, 31]

Z literatúry vyplýva, že pre analýzu katecholamínov a ich prekursorov sa spojenie LC-MS ukázalo ako využiteľné. A keďže sa jedná o polárne látky, tak sa zväčša volí elektrosprejová ionizačná technika. [21, 34, 45, 46, 47]

### **Chemiluminiscenčné detektory (CL)**

Chemiluminiscenčné detektory v spojení s kvapalinovou chromatografiou poskytujú vysokú selektivitu a citlivosť pre analýzu analytov. Chemiluminiscencia je schopnosť látok emitovať žiarenie (luminiskovať) po dodaní energie z chemickej reakcie. Ak látka po chemickej reakcii priamo emituje žiarenie, hovoríme o priamej chemiluminiscencii. Nepriama chemiluminiscencia je jav, pri ktorom je emitované žiarenie predané ďalšej látke, ktorá luminiskuje. [34, 48]

Štúdie pre detekciu katecholamínov pomocou chemiluminiscenčnej detekcie sú založené na použití chemiluminiscenčných činidiel, a to peroxooxalátov alebo luminolu v alkalickom prostredí. [49, 50, 51]

### 3.4.7. Vybrané základné chromatografické parametre

Chromatografické parametre charakterizujú separačný proces. Medzi základné chromatografické parametre patrí: retenčný čas ( $t_R$ ), mŕtvy retenčný čas ( $t_0$ ), retenčný faktor ( $k$ ), selektivita ( $\alpha$ ), účinnosť a rozlíšenie ( $R_s$ ). [12]

#### Retenčný čas

Retenčný čas ( $t_R$ ) udáva dobu, ktorá uplynie od doby nástreku vzorky na kolónu po maximum daného píku na chromatograme v jednotkách času (minúty). Keďže je jeho hodnota závislá od prietoku MF (vyšší prietok = nižší retenčný čas a naopak), nejedná sa o univerzálny chromatografický parameter. [12]

#### Mŕtvy retenčný čas

Mŕtvy retenčný čas ( $t_0$ ) je chromatografický parameter udávajúci dobu v jednotkách času (minúty), ktorá uplynie od doby nástreku analytu na kolónu po jeho vyplavenie z kolóny bez akejkoľvek predošlej interakcie so SF. [12]

#### Retenčný faktor

Retenčný faktor ( $k$ ), označovaný aj ako kapacitný faktor ( $k'$ ), je chromatografický parameter, ktorý je možné vypočítať z retenčného a mŕtveho retenčného času podľa nasledujúceho vzorca uvedeného v ČL 2017,

$$k = \frac{(t_R - t_0)}{t_0}$$

kde  $t_R$  je retenčný čas a  $t_0$  je mŕtvy retenčný čas. [3] Nakoľko táto charakteristika separačného procesu je bezrozmerná a nezávislá od prietoku MF a rozmerov kolóny, jedná sa o veľmi spoľahlivý chromatografický parameter. [12]

#### Účinnosť

Tento chromatografický parameter udáva zdanlivú účinnosť prechodu analytu medzi povrchom SF a MF. K určeniu sa využíva počet teoretických priehradiek ( $N$ ), ktorého hodnotu možno vypočítať podľa vzorca uvedeného v ČL 2017,

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

kde  $t_R$  je retenčný čas a  $w_h$  je šírka píku v polovici jeho výšky. [3]

## **Selektivita**

Selektivita ( $\alpha$ ) udáva schopnosť chromatografického systému rozlíšiť rozličné analyty. Možno ju určiť ako pomer retenčných faktorov 2 vybraných analytov. [12]

## **Rozlíšenie**

Rozlíšenie ( $R_s$ ) je charakteristika popisujúca ako dobre sú píky od seba separované. Na rozdiel od selektivity sa do úvahy berie aj šírka píky a preto možno rozlíšenie považovať za objektívnejší parameter. [12] Pre výpočet je možné použiť nasledovný vzorec z ČL 2017,

$$R_s = 1,18 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{h2} + w_{h1}}$$

kde  $t_{R1}$ ,  $t_{R2}$  = retenčné časy píkov a  $w_{h1}$ ,  $w_{h2}$  = šírky píkov v polovičnej výške. [3]

### 3.5.Štúdie pre stanovenie katecholamínov v HILIC podmienkach

V nasledujúcich tabuľkách 2–6 je uvedený prehľad chromatografických podmienok vyhládaných v literatúre použitých pre analýzu skúmaných látok v HILIC podmienkach. Jedná sa o rešerš literatúry publikovanej od roku 2008.

*Tabuľka 2: Štúdia pre stanovenie katecholamínov v HILIC podmienkach za použitia MS detekcie [21]*

<b>Skúmané analyty</b>	tyrozín, L-DOPA, dopamín, noradrenalín, adrenalín, 3-metoxytyramín, metanefrín, normetanefrín, isoproterenol (IS)
<b>Typ biologického materiálu</b>	tkanivo potkaních nadobličiek
<b>Metóda prípravy vzoriek</b>	homogenizácia
<b>Objem nástreku</b>	2 µl
<b>Kolóna (rozmery, veľkosť častíc)</b>	Kromasil™ Cyano (150,0 mm × 2,1 mm; 5 µm)
<b>Zloženie MF</b>	acetonitril/voda + kyselina mravčia (60:40, v/v) pH 3,0
<b>Typ elúcie</b>	izokratická elúcia
<b>Teplota (°C)</b>	20 °C
<b>Rýchlosť prietoku (ml/min)</b>	0,2 ml/min
<b>Čas analýzy (min)</b>	10 min
<b>Spôsob detekcie</b>	detekcia pomocou hmotnostnej spektrometrie (ESI – pozitívny mód)

*Tabuľka 3: Štúdia pre stanovenie katecholamínov v HILIC podmienkach za použitia MS detekcie [23]*

<b>Skúmané analyty</b>	sérotonín, tryptofan, tyrozín, L-DOPA, dopamín, noradrenalín, adrenalín, 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina, 5-hydroxyindol-3-octová kyselina, homovanilová kyselina, 3-metoxytyramín, 3,4-dihydroxybenzylalanín (IS)
<b>Typ biologického materiálu</b>	ovčie mozgové extrakty
<b>Metóda prípravy vzoriek</b>	homogenizácia
<b>Objem nástreku</b>	5 µl
<b>Kolóna (rozмеры, veľkosť častíc)</b>	TSK gel Amide 80 (250,0 mm × 2,0 mm; 5 µm)
<b>Zloženie MF</b>	acetonitril/20 mM octan amónny (80:20, v/v) pH 3,0
<b>Typ elúcie</b>	izokratická elúcia
<b>Teplota (°C)</b>	20 °C
<b>Rýchlosť prietoku (ml/min)</b>	0,2 ml/min
<b>Čas analýzy (min)</b>	20 min
<b>Spôsob detekcie</b>	detekcia pomocou hmotnostnej spektrometrie (ESI – pozitívny mód)

**Tabuľka 4:** Štúdia pre stanovenie katecholamínov v HILIC podmienkach za použitia elektrochemickej detekcie [25]

<b>Skúmané analyty</b>	dopamín, noradrenalín, adrenalín	
<b>Typ biologického materiálu</b>	ľudský moč	
<b>Metóda prípravy vzoriek</b>	extrakcia na pevnej fáze (SPE)	
<b>Objem nástreku</b>	5 µl	
<b>Kolóna (rozmery, veľkosť častíc)</b>	ZIC-HILIC (250,0 mm × 4,6 mm; 5 µm)	BEH-Amide (150,0 mm × 4,6 mm; 3 µm)
<b>Zloženie MF</b>	6,5 mM mravčan amónny/acetónitril (25:75, v:v) pH 3,0	6,5 mM mravčan amónny/acetónitril (15:85, v:v) pH 3,0
<b>Typ elúcie</b>	izokratická elúcia	
<b>Teplota (°C)</b>	30 °C	
<b>Rýchlosť prietoku (ml/min)</b>	1,0 ml/min	
<b>Čas analýzy (min)</b>	12 min	
<b>Spôsob detekcie</b>	elektrochemická (coulometrická) detekcia	

**Tabuľka 5:** Štúdia pre stanovenie katecholaminov v HILIC podmienkach za použitia fluorimetrickej detekcie [26]

<b>Skúmané analyty</b>	L-DOPA, dopamín, noradrenalín, adrenalín, 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina, 3,4-dihydroxyfenylglykol, 3,4-dihydroxymandľová kyselina, 3,4-dihydroxybenzylamín (IS)
<b>Typ biologického materiálu</b>	moč potkanov
<b>Metóda prípravy vzoriek</b>	extrakcia na pevnej fáze (SPE)
<b>Objem nástreku</b>	5 $\mu$ l
<b>Kolóna (rozmery, veľkosť častíc)</b>	ZIC-cHILIC (150,0 mm $\times$ 2,1 mm; 3 $\mu$ m)
<b>Zloženie MF</b>	acetonitril/10 mM mravčan amónny (75:25, v/v) pH 2,5
<b>Typ elúcie</b>	izokratická elúcia
<b>Teplota (°C)</b>	35 °C
<b>Rýchlosť prietoku (ml/min)</b>	0,2 ml/min
<b>Čas analýzy (min)</b>	15 min
<b>Spôsob detekcie</b>	fluorimetrická detekcia

**Tabuľka 6:** Štúdiá pre stanovenie katecholamínov v HILIC podmienkach za použitia fluorimetrickej detekcie [27]

<b>Skúmané analyty</b>	L-DOPA, dopamín, noradrenalín, adrenalín, 3,4-dihydroxyfenylactová kyselina, 3,4-dihydroxyfenylglykol, 3,4-dihydroxymandľová kyselina, deoxyepinefrín
<b>Typ biologického materiálu</b>	moč potkanov
<b>Metóda prípravy vzoriek</b>	nariadenie fosfátovým pufrom a následná selektívna extrakcia na predkolóne
<b>Objem nástreku</b>	5 µl
<b>Kolóna (rozmery, veľkosť častíc)</b>	Inertsil Amide (150,0 mm × 3,0 mm; 5 µm)
<b>Zloženie MF</b>	acetonitril/20 mM mravčan amónny (80:20, v/v) pH 2,5
<b>Typ elúcie</b>	izokratická elúcia
<b>Teplota (°C)</b>	35 °C
<b>Rýchlosť prietoku (ml/min)</b>	0,5 ml/min
<b>Čas analýzy (min)</b>	10 min
<b>Spôsob detekcie</b>	fluorimetrická detekcia

Z tabuliek 2–6 vyplýva, že v literatúre sa najčastejšie stretávame s analýzou vzoriek moču, ktoré sú upravené homogenizáciou alebo extrakciou na pevnej fáze, s kolónami na báze silikagélu modifikovaného amidovými alebo sulfoalkylbetainovými skupinami, MF obsahujúcimi zmes acetonitrilu a mravčanu amónneho, izokratickou elúciou, s časom analýzy do 20 minút a fluorimetrickou alebo MS detekciou.



## 4. Metodická časť

### 4.1. Chemikálie, inštrumentácia, prístroje, laboratórne pomôcky

#### 4.1.1. Chemikálie

Nasledovné chemikálie boli použité pre analýzu katecholamínov a ich prekurzorov v tejto diplomovej práci:

- ( $\pm$ )-adrenalin hydrochlorid: Sigma-Aldrich, Nemecko
- 3,4-dihydroxy-L-fenylalanín: Sigma-Aldrich, Nemecko
- acetonitril: VWR International, Francúzsko
- amoniak, vodný roztok 25–29%: PENTA s.r.o., Česká republika
- DL-noradrenalin hydrochlorid: Sigma-Aldrich, Nemecko
- dopamín hydrochlorid: Sigma-Aldrich, Nemecko
- hydroxid sodný koncentrovaný (Český lékopis, ČL): Penta s.r.o., Česká republika
- kyselina mravčia 88%: Sigma-Aldrich, Nemecko
- kyselina octová 99%: PENTA s.r.o., Česká republika
- L-tyrozín: Sigma-Aldrich, Nemecko
- mravčan amónny: PENTA s.r.o., Česká republika
- octan amónny: PENTA s.r.o., Česká republika
- voda čistená reverznou osmózou

#### 4.1.2. Inštrumentácia

Pre účely analýzy bola použitá HPLC zostava s týmito charakteristikami:

- HPLC jednotka: Shimadzu, Japonsko
- riadiaca jednotka: CBM-20A
- degasser: DGU-20A<sub>3</sub>
- čerpadlo: LC-20AD<sub>XR</sub>
- autosampler: SIL-20AC<sub>XR</sub>
- termostat kolóny: CTO-20AC
- detektory: UV-VIS SPD-20A, Fluorescence RF-10A<sub>XL</sub>
- PC program: Lab Solutions, verzia 5.97 SP 1

### 4.1.3. Prístroje a laboratórne pomôcky

Prístroje a laboratórne pomôcky uvedené nižšie boli použité pre prípravu mobilnej fázy a roztokov pre analýzu:

- analytické váhy: Sartorius A200S Electronic Analytical Balance, Sartorius analytical, Nemecko
- magnetická miešačka: Color squid, Ika Werke, Nemecko
- odsávačka: Mevacs M46, Medist, Slovensko
- pH meter: SCHOTT CG 843, Schott Instruments GmbH, Nemecko
- ultrazvukový kúpeľ: Kraintek K-10, KRAINTEK s.r.o., Česká republika
- vortex: Velp, Scientifica, Taliansko
- automatické pipety, špičky, digestor, filtračné banky, sklenená fritá, filtre (veľkosť pórov 0,22  $\mu\text{m}$ ), kadičky, laboratórne lyžičky, miešadlo, vialky, strička, byreta, odmerné banky, lievnik...

## 4.2. Obecné postupy

### 4.2.1. Príprava MF

Príprava MF spočívala v príprave vodnej zložky (zmiešanie vody s kyselinou alebo pufrom – pufer použitý v prípade potreby úpravy pH), jej zmiešaním s organickou zložkou (acetonitril), ktorej množstvo bolo v rozmedzí 5–90 %, prefiltrovaním cez sklenenú fritu a následne filtrom s veľkosťou pórov 0,22  $\mu\text{m}$ .

Mobilná fáza bola pre účely analýzy v tejto diplomovej práci pripravovaná dvomi spôsobmi:

- 1) V kadičke sa zmiešala voda s vopred stanoveným množstvom kyseliny alebo pufru na magnetickej miešačke a následne sa pridala organická zložka v podobe acetonitrilu. Objemy potrebné pre prípravu boli merané odmerným valcom, v prípade kyseliny automatickou pipetou. Navážky pre prípravu pufru boli vážené na analytických váhach.
- 2) MF bola pripravovaná do odmernej banky za pomoci byrety, v ktorej boli merané objemy organickej zložky a vody. Potrebný objem kyseliny bol pridaný pomocou automatickej pipety. MF sa následne premiešala v ultrazvukovom kúpeli.

Tabuľka 7 uvádza prehľad mobilných fáz, ktoré boli v priebehu tejto diplomovej práce pripravované:

*Tabuľka 7: Prehľad MF použitých v DP.*

Označenie MF	Zloženie MF	Poznámky
MF A	AA v zmesi ACN:H <sub>2</sub> O	AA v rôznych koncentráciách (2,5; 5; 10; 25; 50 mM)
MF B	25 mM acetátových iónov (CH <sub>3</sub> COOH + CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> ) v zmesi ACN:H <sub>2</sub> O	pH vodnej zložky MF = 3,50
MF C	25 mM acetátových iónov (CH <sub>3</sub> COOH + CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> ) v zmesi ACN:H <sub>2</sub> O	pH vodnej zložky MF = 4,50
MF D	25 mM FA v zmesi ACN:H <sub>2</sub> O	—
MF E	25 mM mravčích iónov (HCOOH + HCOONH <sub>4</sub> ) v zmesi ACN:H <sub>2</sub> O	pH vodnej zložky MF = 3,50
MF F	25 mM mravčích iónov (HCOOH + HCOONH <sub>4</sub> ) v zmesi ACN:H <sub>2</sub> O	pH vodnej zložky MF = 4,50

Pre analýzy bola využitá izokratická elúcia pomocou 1 pumpy (vopred zmiešaná vodná aj organická zložka) alebo 2 púmp (pumpa A = vodná zložka a pufer; pumpa B = organická zložka a pufer).

#### 4.2.2. Príprava štandardných roztokov

Zásobné štandardné roztoky analyzovaných látok (tyrozín, L-DOPA, dopamín, noradrenalín, adrenalín) boli pripravené navážením približne 0,5 mg látky a rozpustením v 0,1% roztoku kyseliny mravčej v metanole, ktorým bola dosiahnutá koncentrácia 0,1 mg/ml. Pre adrenalín, noradrenalín a dopamín bol použitý 50% metanol, v prípade tyrozínu a L-DOPA bol použitý 10% metanol kvôli nízkej rozpustnosti daných analytov v organických rozpúšťadlách. Pre kvantitatívne rozpustenie látok bol následne použitý ultrazvukový kúpeľ a zásobné roztoky boli skladované v mrazničke pri teplote -20 °C. Pre analýzy boli tieto zásobné roztoky rozmrazené, premiešané a ďalej nariadené acetonitrilom na požadovanú finálnu koncentráciu, ktorá činila 1 µg/ml. Týmto spôsobom boli pripravované ako roztoky štandardov, tak aj roztok zmesi všetkých 5 štandardov.

### 4.3. Popis experimentálnej práce

Skríning retenčného správania analytov v rôznych HILIC podmienkach bol vykonaný pomocou 4 rôznych kolón s odlišným typom stacionárnej fázy. Zoznam týchto kolón spolu s ich základnými parametrami je uvedený v tabuľke 8:

*Tabuľka 8: Zoznam kolón použitých v DP.*

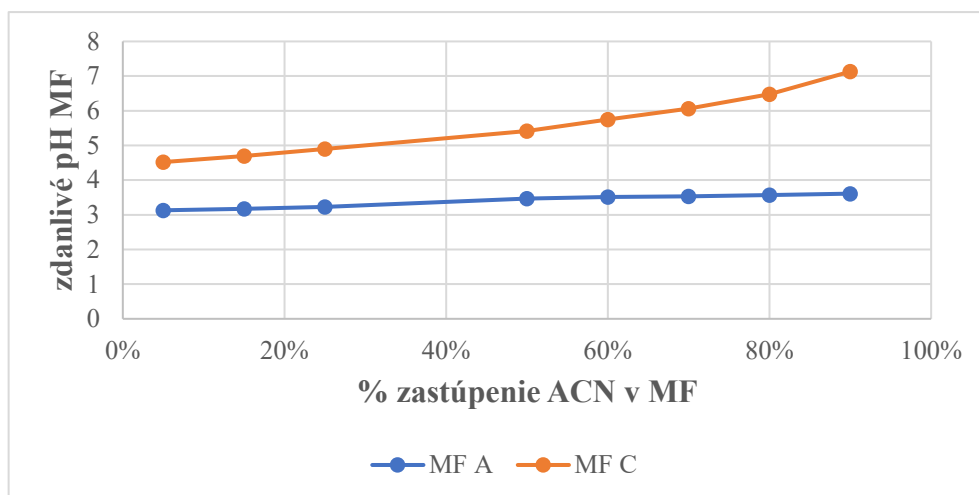
Názov kolóny	Parametre kolóny (rozмеры; veľkosť častíc; veľkosť pórov)	Typ SF	Výrobca kolóny
LUNA 3 µm PFP(2)	100,0 mm × 2,0 mm; 3,0 µm; 100 Å	Silikagél modifikovaný pentafluórofenylovými (PFP) skupinami	Phenomenex
XBridge BEH Amide	100,0 mm × 3,0 mm; 3,5 µm; 130 Å	Silikagél s Bridge Ethylene Hybrid technológiou modifikovaný amidovými skupinami	Waters
Avantor ACE HILIC-A	150,0 mm × 3,0 mm; 3,0 µm; 100 Å	Čistý silikagél	Avantor
Sequant ZIC-HILIC	100,0 mm × 2,1 mm; 3,5 µm; 100 Å	Silikagél modifikovaný sulfoalkylbetainovými skupinami tvoriacimi permanentný zwitterión	Merck

## 5. Experimentálna časť a diskusia

### 5.1.Reverzný mód vs. HILIC mód

#### 5.1.1. LUNA 3 $\mu\text{m}$ PFP(2)

Ako prvá pre analýzy bola použitá kolóna LUNA 3  $\mu\text{m}$  PFP(2), ktorá je stabilná v pH rozmedzí 1,5–8 a poskytuje selektivitu analytov pomocou nasledujúcich mechanizmov – vodíkové väzby, aromatické a  $\pi$ - $\pi$  interakcie, dipól-dipól interakcie a hydrofóbne interakcie. Nakoľko kolóna zahŕňa hydrofilné aj hydrofóbne interakcie, tak bola využitá na skríning vplyvu zmeny percentuálneho podielu organickej zložky v MF (5–90 % ACN) pri nezmenenom a aj upravenom pH vodnej zložky MF na retenciu skúmaných analytov. Zmena zdanlivého pH mobilných fáz použitých pre tento skríning je zosumarizovaná v grafe 2:



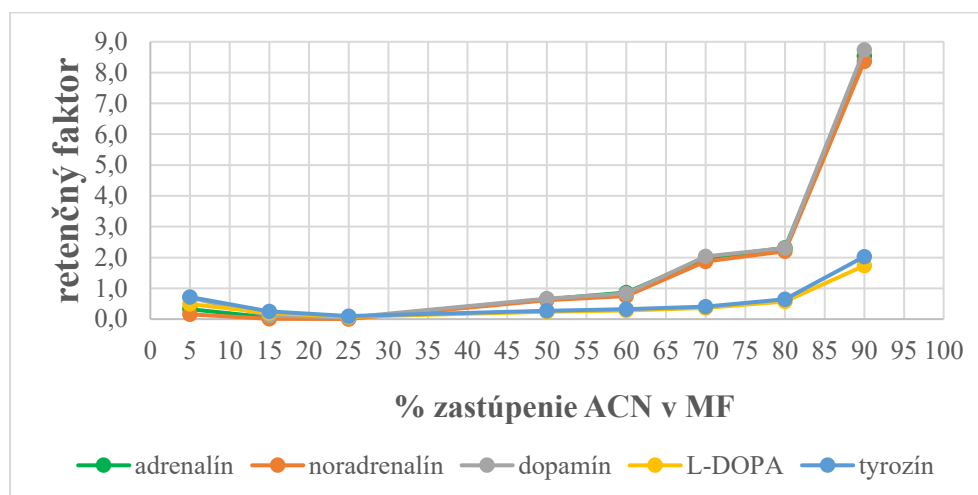
**Graf 2:** Závislosť zdanlivého pH MF na % zastúpení ACN v MF. Použité MF: MF A = 25 mM AA v zmesi ACN:H<sub>2</sub>O; MF C = 25 mM acetátových iónov (CH<sub>3</sub>COOH + CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>) v zmesi ACN:H<sub>2</sub>O (pH vodnej zložky = 4,50). Použitá kolóna: LUNA 3  $\mu\text{m}$  PFP(2) (100,0 mm  $\times$  2,0 mm; 3  $\mu\text{m}$ ; 100 Å; Phenomenex).

#### 5.1.1.1. Vplyv % organického rozpúšťadla

Z nameraných hodnôt v grafe 3 vyplýva, že pri nízkych % organickej zložky v MF (5–25 %) je retencia analytov nízka a so stúpajúcim % ACN sa ich retencia ešte znižuje. Deje sa tak v dôsledku pôsobenia hydrofóbnych interakcií medzi SF a analytmi, ktoré sú typickým znakom chromatografie v reverznom móde, o ktorom vieme, že so znižovaním polarita MF sa retencia analytov znižuje. Toto tvrdenie o znaku RP-LC ďalej potvrdzuje aj fakt, že adrenalín, noradrenalín a dopamín majú v tomto rozmedzí organickej zložky v MF nižšiu retenciu ako L-DOPA a tyrozín, keďže sú polárnejšie. [12, 52]

V strednej oblasti (50–60 % ACN) možno pozorovať mierne zvýšenie retencie. Na SF sa začína sorbovať vrstva vody, čím sa zamedzí dominantnému vplyvu hydrofóbných interakcií a dochádza tak k postupnému vyrovnaniu hydrofóbných a hydrofilných interakcií. Pozorovať možno aj zmenu selektivity – polárnejšie analyty (adrenalín, noradrenalín, dopamín) majú vyššiu retenciu ako tyrozín a L-DOPA.

Pri dominantnom zastúpení organického rozpúšťadla v MF (60–90 % ACN) retencia rastie so zvyšujúcim sa podielom ACN v MF a najvyššiu retenciu analyty dosahujú pri 90 % ACN, čo je prejavom prevládajúcich hydrofilných interakcií a HILIC módu. Na povrchu SF sa sorbovaním vrstvy vody vytvára tzv. vodná pseudostacionárna fáza. Vzhľadom na skutočnosť, že polárne analyty majú k vode vysokú afinitu, tak práve vďaka vytvoreniu pseudostacionárnej fázy sú analyty na kolóne dlhšie zadržované a so znižovaním podielu vodnej zložky v MF ich retencia rastie. [52, 53]

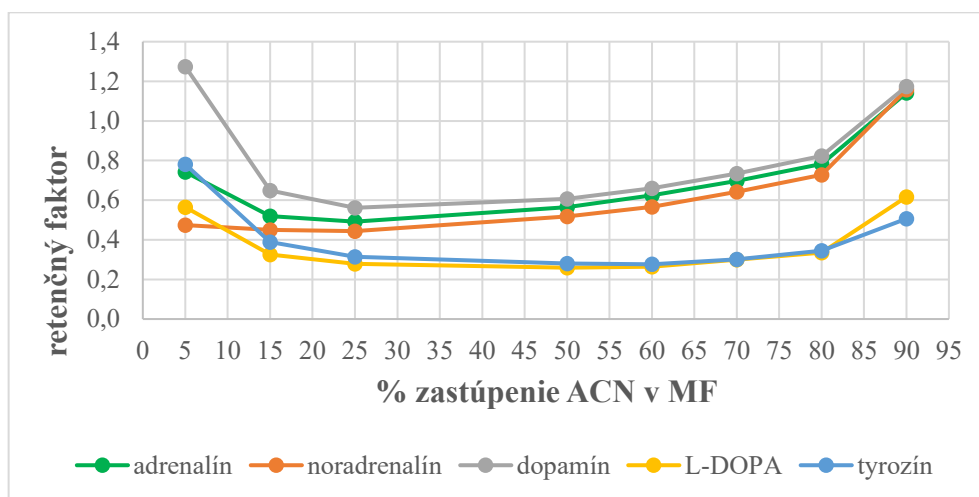


**Graf 3:** Závislosť retenčného faktoru na % zastúpení ACN v MF. Použitá MF: MF A = 25 mM AA v zmesi ACN:H<sub>2</sub>O. Použitá kolóna: LUNA 3 μm PFP(2) (100,0 mm × 2,0 mm; 3 μm; 100 Å; Phenomenex).

### 5.1.1.2. Vplyv pH

Následne bol na rovnakej kolóne vykonaný skrining retenčného správania analytov v závislosti na pH vodnej zložky MF. Podľa grafu 4 možno konštatovať, že pri zvýšení pH vodnej zložky MF je retencia všetkých analytov vyššia v prípade nižšieho zastúpenia organickej zložky (reverzná fáza), ale pri vyšších % organiky (HILIC mód) je naopak retencia nižšia.

Príčinou markantného zníženia retencie v HILIC móde, najmä v prípade katecholamínov, môže byť oslabenie vodíkových a dipól-dipól interakcií medzi elektronegatívnym fluórom a kladne nabitou  $-NH_2$  skupinou analytov vplyvom vyššieho pH MF.



**Graf 4:** Závislosť retenčného faktoru na % zastúpení ACN v MF pri upravenom pH vodnej zložky MF na 4,50.

Použitá MF: MF C = 25 mM acetátových iónov ( $CH_3COOH + CH_3COONH_4$ ) v zmesi ACN:H<sub>2</sub>O

(pH vodnej zložky = 4,50). Použitá kolóna: LUNA 3  $\mu$ m PFP(2) (100,0 mm  $\times$  2,0 mm; 3  $\mu$ m; 100  $\text{\AA}$ ; Phenomenex).

## 5.2.HILIC mód

Pre objasnenie retenčného správania skúmaných analytov v HILIC móde boli vybrané kolóny s 3 rôznymi typmi stacionárnych fáz, ktoré sú typické pre analýzu polárnych látok v HILIC móde. Použitá bola stacionárna fáza neutrálneho charakteru (kolóna XBridge BEH Amide) a 2 stacionárne fázy s iónovými skupinami – čistý silikagél (kolóna Avantor ACE HILIC-A) a zwitteriónová stacionárna fáza (kolóna Sequant ZIC-HILIC).

Nakoľko sa v prípade HILIC módu používajú MF s vyšším podielom organického rozpúšťadla oproti vode, tak v zostávajúcich meraniach tejto DP sú využívané práve už len vyššie % organického rozpúšťadla v MF.

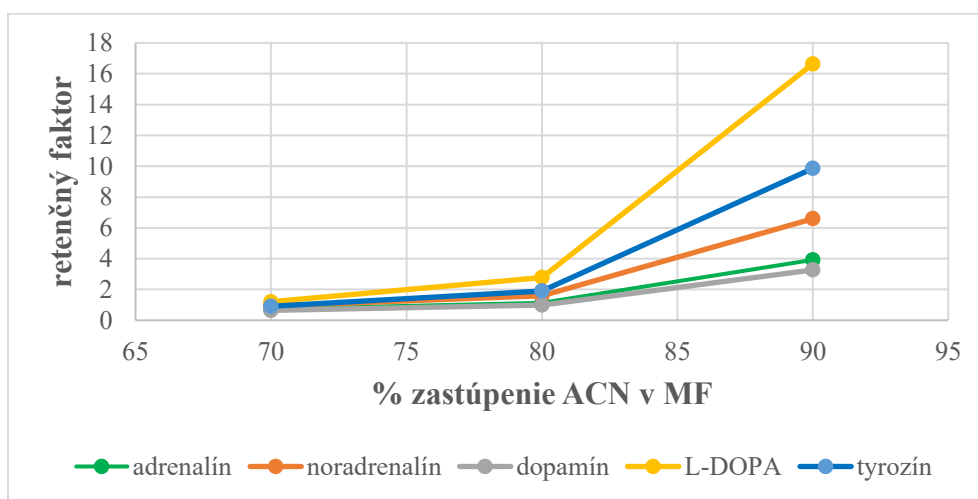
## 5.2.1. Vplyv chémie stacionárnej fázy

### 5.2.1.1. Neutrálne stacionárne fázy

Kolóna XBridge BEH Amide je zástupcom kolón s neutrálnou stacionárnou fázou. Stacionárna fáza tejto kolóny je tvorená BEH (Bridge Ethylene Hybrid) časticami s pripojenou amidovou skupinou. Táto neutrálna SF je stabilná v pH rozmedzí 2–11 a retencia analytov je ovplyvnená primárne hydrofilnými interakciami.

Z výsledkov uvedených v grafe 5 vyplýva, že selektivita na tejto kolóne je skutočne daná predovšetkým hydrofilnými interakciami medzi analytmi a SF – rolu tu hrá počet funkčných skupín analytov správajúcich sa ako donor alebo akceptor vodíkovej väzby, ktoré sú schopné vytvoriť vodíkovú väzbu s amidovou skupinou SF. [54]

Najvyššiu retenciu preto pozorujeme v prípade L-DOPA a tyrozínu. Pri 80 % a 90 % ACN v MF sa podarilo dosiahnuť dobrú separáciu pík noradrenalínu, L-DOPA a tyrozínu, avšak píky adrenalínu a dopamínu koeluovali.



**Graf 5:** Závislosť retenčného faktoru na % zastúpení ACN v MF. Použitá MF: MF A = 25 mM AA v zmesi ACN:H<sub>2</sub>O. Použitá kolóna: XBridge BEH Amide (100,0 mm × 3,0 mm; 3,5 μm; 130 Å; Waters).

Vzhľadom na prijateľný čas analýzy a tvar chromatografických pík za použitia MF s podielom ACN 80 %, bol ďalej na tejto kolóne skúmaný vplyv koncentrácie aditíva.

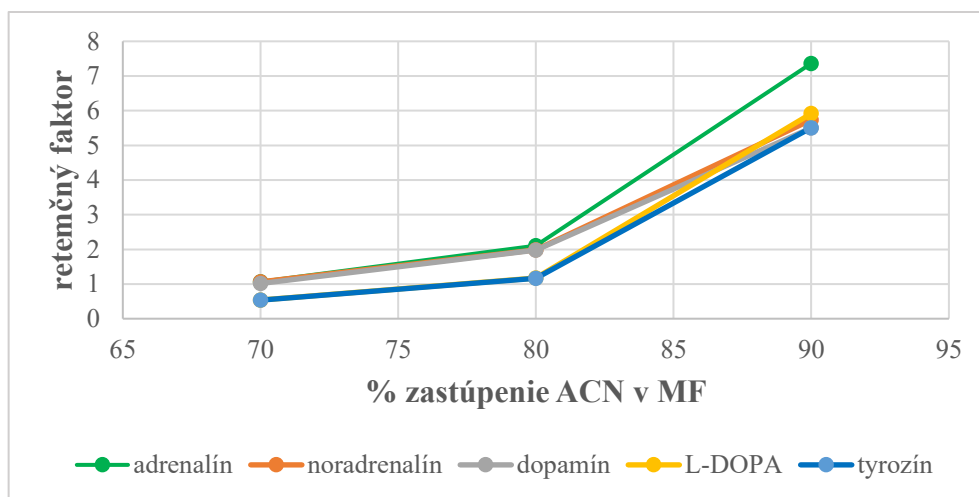
### 5.2.1.2. Stacionárne fázy s iónovými skupinami

Prvou z dvojice použitých kolón s obsahom SF s iónovými skupinami bola kolóna Avantor ACE HILIC-A. Stacionárna fáza je tvorená čistým silikagélom. Týmto chemickým charakterom vykazuje kolóna schopnosť hydrofilných a iónových interakcií na rozdiel od XBridge BEH Amide kolóny, ktorá iónovú interakčnú schopnosť nemá.



Vychádzajúc z výsledkov uvedených v grafe 6, na zvýšení retencie so stúpajúcim podielom organiky v MF majú okrem hydrofilných interakcií vplyv aj iónové interakcie medzi záporne nabitými silanolovými skupinami SF a kladne nabitými  $-NH_2$  skupinami analytov. [56]

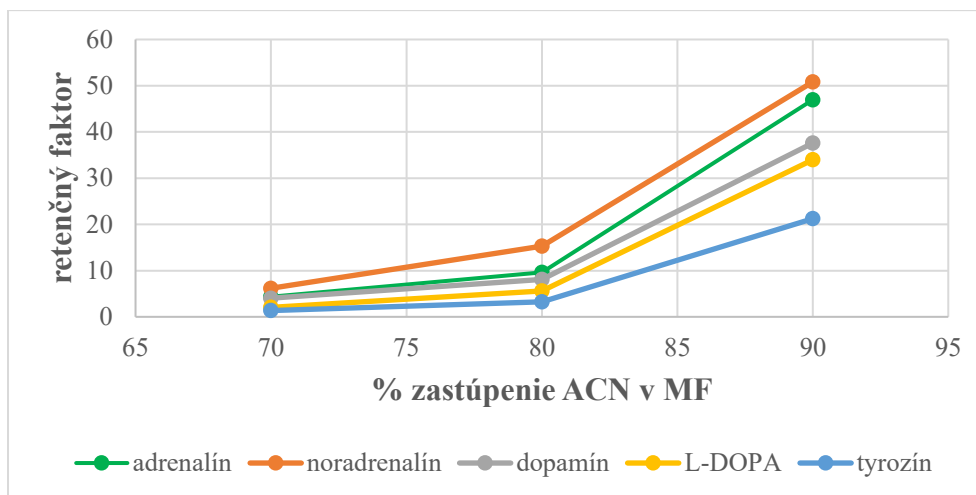
Najvyššiu retenciu z katecholamínov dosahuje adrenalín. Retencia tyrozínu a L-DOPA je pri 70 % a 80 % ACN v porovnaní s katecholamínmi nižšia, pravdepodobne kvôli repulzným interakciám medzi záporne nabitou  $-COOH$  skupinou a záporne nabitými silanolovými skupinami. Pri MF pozostávajúcej z 90 % ACN možno pozorovať zmenu selektivity a retencie analytov v porovnaní s MF pozostávajúcou z 80 % ACN. Navyše, retencia analytov je tu spojená s abnormálnym tvarom pík, ktoré sú rozmyté.



**Graf 6:** Závislosť retenčného faktoru na % zastúpení ACN v MF. Použitá MF: MF A = 25 mM v zmesi ACN:H<sub>2</sub>O. Použitá kolóna: Avantor ACE-HILIC A (150,0 mm × 3,0 mm; 3 μm; 100 Å; Avantor).

Druhou použitou kolónou obsahujúcou SF s iónovými skupinami bola kolóna Sequant ZIC-HILIC. Jej stacionárna fáza je tvorená silikagélom modifikovaným kovalentne pripojenými funkčnými skupinami tvoriacimi permanentný zwitterión (sulfónová skupina a kvartérna amóniová skupina). Okrem polárnych interakcií sa na retenčnom mechanizme teda ďalej podieľajú aj interakcie iónové, a to medzi kladnými aj zápornými funkčnými skupinami analytov a SF. Podľa grafu 7 je zrejmé, že analyty vykazujú typické HILIC správanie pri zvyšovaní % podielu ACN v MF. [56]

Kolóna Sequant ZIC-HILIC poskytuje lepšiu separáciu a vyššiu retenciu pre skúmané analyty v porovnaní s kolónou ACE-HILIC A. Nakoľko kolóna poskytuje dobrú separáciu a prijateľný čas analýzy za použitia MF s podielom ACN:H<sub>2</sub>O = 80:20, bol ďalej na tejto kolóne skúmaný vplyv koncentrácie aditíva, vplyv zloženia a pH MF.



**Graf 7:** Závislosť retenčného faktoru na % zastúpení ACN v MF. Použitá MF: MF A = 25 mM AA v zmesi ACN:H<sub>2</sub>O. Použitá kolóna: Sequant ZIC-HILIC (100,0 mm × 2,1 mm; 3,5 μm; 100 Å; Merck).

### 5.2.1.3. Súhrn

Tabuľka 9 ponúka porovnanie retenčného správania analytov v podobe uvedených retenčných faktorov za použitia MF s rovnakým zložením – 25 mM AA v zmesi ACN:H<sub>2</sub>O v pomere 80:20. Na jej základe možno konštatovať, že retencia katecholamínov je najnižšia na kolóne XBridge BEH Amide a naopak najvyššia na kolóne Sequant ZIC-HILIC. Z toho vyplýva, že katecholamíny dosahujú na SF obsahujúcich iónové skupiny vyššiu retenciu ako v prípade neutrálnej SF. V prípade L-DOPA a tyrozínu je retencia najvyššia na zwitteriónovej SF a naopak najnižšia na kolóne s čistým silikagélom.

**Tabuľka 9:** Porovnanie retenčného faktoru skúmaných analytov za použitia MF s rovnakým zložením na kolónach XBridge BEH Amide, Avantor ACE-HILIC A, Sequant ZIC-HILIC. Použitá MF: MF A = 25 mM AA v zmesi ACN:H<sub>2</sub>O v pomere 80:20.

	retenčný faktor na kolóne XBridge BEH Amide	retenčný faktor na kolóne Avantor ACE-HILIC A	retenčný faktor na kolóne Sequant ZIC-HILIC
<b>adrenalín</b>	1,14	2,10	9,63
<b>noradrenalín</b>	1,59	1,98	15,32
<b>dopamín</b>	0,98	1,98	8,07
<b>L-DOPA</b>	2,78	1,17	5,62
<b>tyrozín</b>	1,89	1,16	3,22

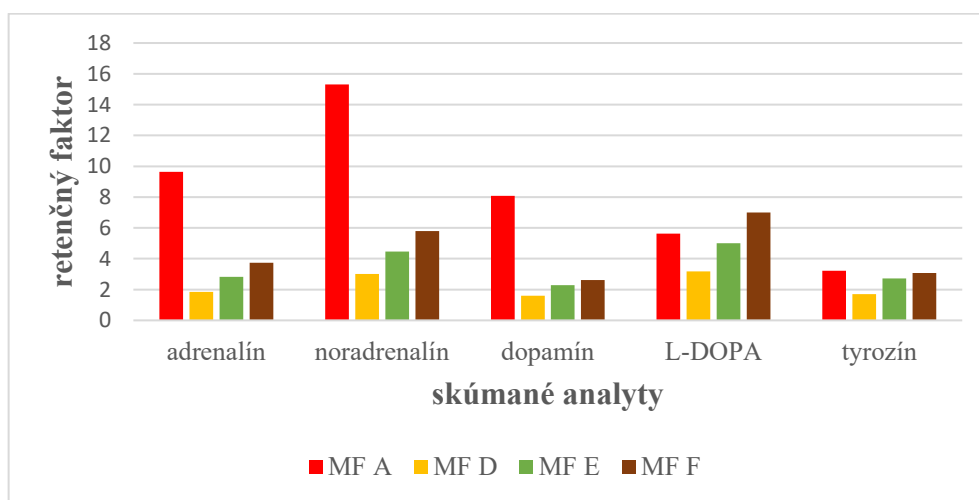
## 5.2.2. Vplyv zloženia a pH mobilnej fázy

### 5.2.2.1. Sequant ZIC-HILIC kolóna

Na kolóne Sequant ZIC-HILIC bol následne testovaný vplyv zloženia mobilnej fázy a pH mobilnej fázy na retenčné správanie analytov. Testované boli MF s aditívami v podobe kyseliny mravčej a kyseliny octovej pri rôznych pH vodnej zložky MF.

V prípade použitia kyseliny mravčej ako aditíva možno zo získaných výsledkov uvedených v grafe 8 povedať, že so zvyšujúcim sa pH vodnej zložky MF rastie retencia všetkých analytov. Vysvetlením môže byť, že pri zvyšujúcom sa pH dochádza k posilneniu elektrostatických interakcií medzi záporne nabitou sulfónovou skupinou SF a kladne nabitou  $-NH_2$  skupinou analytov, a tak sú analyty dlhšie zadržávané. [25, 56]

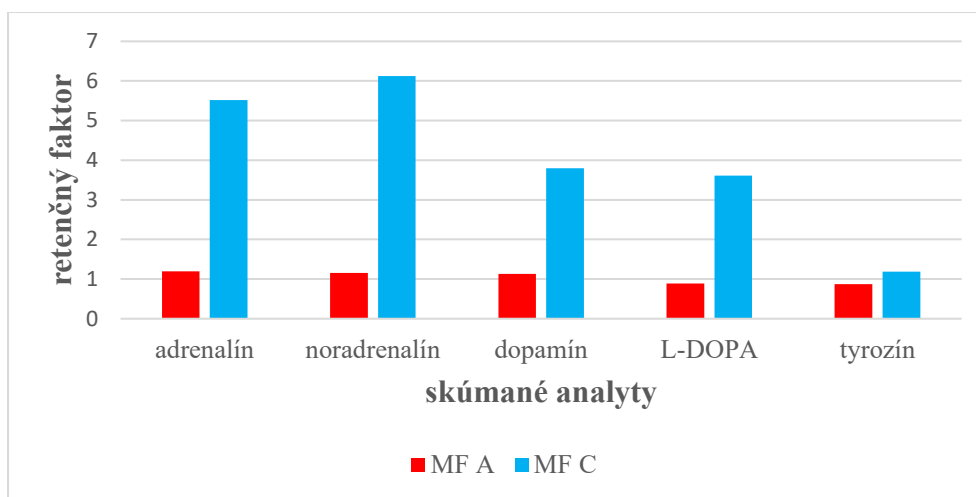
Pri MF obsahujúcej iba kyselinu octovú ako aditívum bola retencia analytov podstatne vyššia ako pri kyseline mravčej, čo možno rovnako demonštrovať pomocou výsledkov na grafe 8. K rozdielnostiam v retencii dochádza pravdepodobne vplyvom chémie iónu a sily vybraného aditíva. Avšak pri zvýšení pH vodnej zložky za použitia octanu amónneho nedošlo k zvýšeniu retencie ako v prípade kyseliny mravčej. S výnimkou píku tyrozínu boli všetky ostatné píky rozmyté, retencia bola nižšia a ťažko zistiteľná z chromatogramu práve kvôli rozmytosti pík. Takéto správanie je zrejme opäť spôsobené v dôsledku použitia daného aditíva a jeho chémie. [57]



**Graf 8:** Závislosť retenčného faktoru na pH vodnej zložky a type aditíva MF. Použité MF: MF A (červená farba) = 25 mM AA v zmesi ACN:H<sub>2</sub>O v pomere 80:20; MF D (žltá farba) = 25 mM FA v zmesi ACN:H<sub>2</sub>O v pomere 80:20; MF E (zelená farba) = 25 mM mravčích iónov (HCOOH + HCOONH<sub>4</sub>) v zmesi ACN:H<sub>2</sub>O v pomere 80:20 (pH vodnej zložky = 3,50); MF F (hnedá farba) = 25 mM mravčích iónov (HCOOH + HCOONH<sub>4</sub>) v zmesi ACN:H<sub>2</sub>O v pomere 80:20 (pH vodnej zložky = 4,50). Použitá kolóna: Sequant ZIC-HILIC (100,0 mm × 2,1 mm; 3,5 μm; 100 Å; Merck).

### 5.2.2.2. Avantor ACE HILIC-A kolóna

Kolóna ACE HILIC-A bola okrem skrínungu vplyvu chémie SF použitá aj na skrínung vplyvu pH MF na retenčné správanie vybraných analytov. Ako vyplýva z grafu 9, zvýšenie pH vodnej zložky MF má za následok nárast retencie u všetkých skúmaných analytov. Deje sa tak v dôsledku toho, že zvýšením pH dochádza k zosilneniu elektrostatických interakcií medzi záporne nabitými -OH skupinami silanolu a kladne nabitými -NH<sub>2</sub> skupinami analytov a analyty sú tak na kolóne dlhšie zadržované. [22]

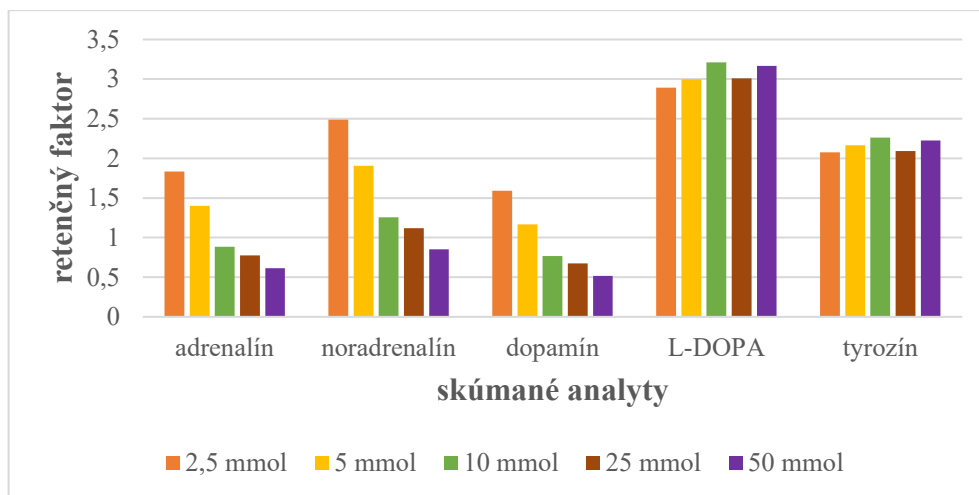


**Graf 9:** Závislosť retenčného faktoru na pH vodnej zložky MF. Použité MF: MF A (červená farba) = 25 mM AA v zmesi ACN:H<sub>2</sub>O v pomere 80:20; MF C (modrá farba): 25 mM acetátových iónov (CH<sub>3</sub>COOH + CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>) v zmesi ACN:H<sub>2</sub>O v pomere 80:20 (pH vodnej zložky = 4,50). Použitá kolóna: Avantor ACE-HILIC A (150,0 mm × 3,0 mm; 3 μm; 100 Å; Avantor).

### 5.2.3. Vplyv koncentrácie aditíva mobilnej fázy

#### 5.2.3.1. XBridge BEH Amide kolóna

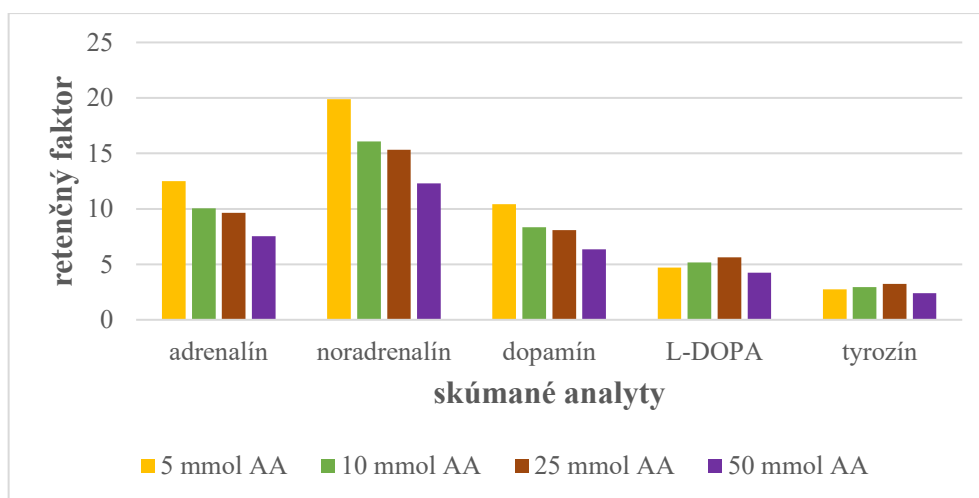
Testované boli koncentrácie 2,5; 5; 10; 25 a 50 mM octovej kyseliny v MF pozostávajúcej z ACN:H<sub>2</sub>O v pomere 80:20. Namerané hodnoty sú uvedené v grafe 10. Pre adrenalin, noradrenalin a dopamin platí, že so zvyšujúcou sa koncentráciou aditíva klesá ich retencia. Možným vysvetlením je narušenie vodíkových väzieb medzi analytmi a SF, teda celkové narušenie ich adsorpcie a tým pokles retencie pri zvyšujúcej sa koncentrácii kyseliny octovej. [58] V prípade analytov s karboxylovou skupinou možno pozorovať, že zmena koncentrácie aditíva nemá významný vplyv na ich retenciu.



**Graf 10:** Závislosť retenčného faktoru na koncentrácii AA v MF. Použitá MF: MF A = AA v zmesi ACN:H<sub>2</sub>O v pomere 80:20. Použitá kolóna: XBridge BEH Amide (100,0 mm × 3,0 mm; 3,5 μm; 130 Å; Waters).

### 5.2.3.2. Sequant ZIC-HILIC kolóna

Na kolóne Sequant ZIC-HILIC boli testované koncentrácie 5; 10; 25 a 50 mM octovej kyseliny v MF pozostávajúcej z ACN a H<sub>2</sub>O v pomere 80:20. Z výsledkov meraní uvedených v grafe 11 môžeme vidieť v prípade adrenalínu, noradrenalínu a dopamínu pokles retencie s rastúcou koncentráciou octovej kyseliny. Pri zvyšovaní koncentrácie octovej kyseliny dochádza k zvýšenej saturácii SF iónmi pufru, čoho dôsledkom je menšie množstvo interakcii ionizovaných skupín katecholamínov so SF – zjednodušene povedané, so zvyšujúcou sa koncentráciou kyseliny sú elektrostatické interakcie viac potlačené. [59, 60] Hovoriac o L-DOPA a tyrozíne, tak koncentrácia aditíva nemá na ich retenciu signifikantný vplyv.

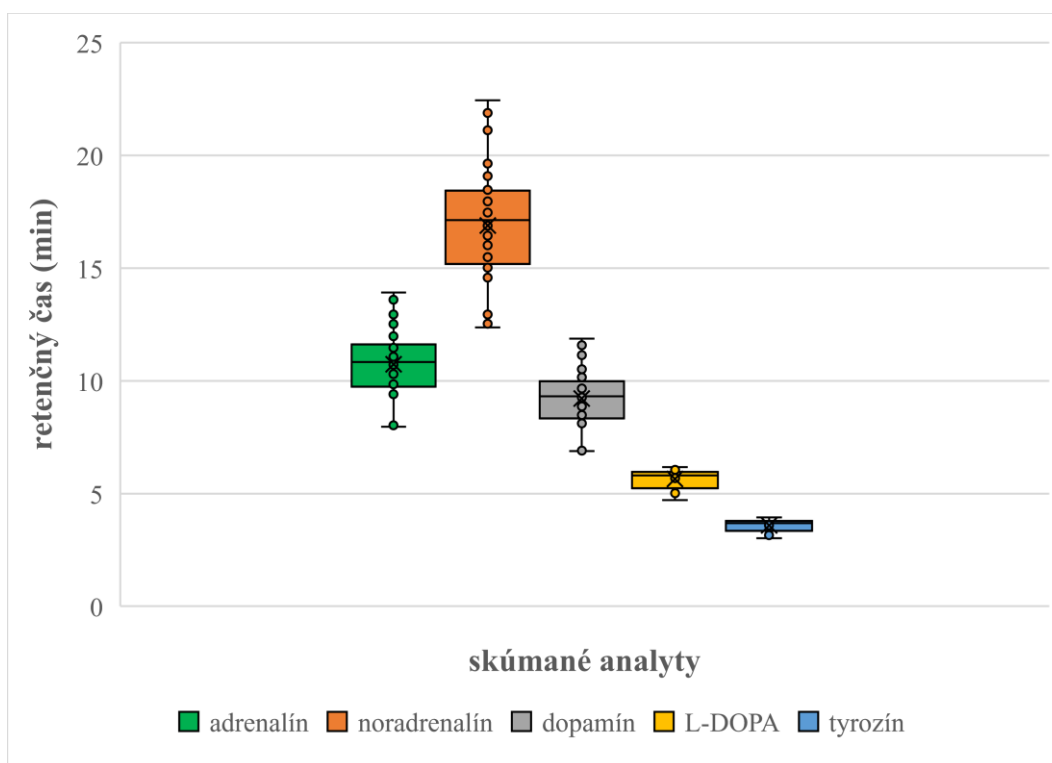


**Graf 11:** Závislosť retenčného faktoru na koncentrácii AA v MF. Použitá MF: MF A = AA v zmesi ACN:H<sub>2</sub>O v pomere 80:20. Použitá kolóna: Sequant ZIC-HILIC (100,0 mm × 2,1 mm; 3,5 μm; 100 Å; Merck).

## 5.3. Komplexnosť ZIC-HILIC

### 5.3.1. Nestabilita retencie

V priebehu meraní sa však ukázalo, že nedostatkom kolóny ZIC-HILIC je nestabilita v retencii jednotlivých analytov, ako možno vidieť v grafe 12. Dochádzalo k odlišným retenciám, najmä v prípade katecholamínov, čím sa nepodarilo dosiahnuť opakovateľnosť výsledkov. K nestálosti retencie mohlo dôjsť v dôsledku nesúrodosti MF či nedostatočnej doby premytia kolóny – rozdielna fyzická koncentrácia MF. Túto nestabilitu sa však nepodarilo odstrániť regeneráciou kolóny podľa popisu výrobcu, odlišnou prípravou MF s využitím presnejšieho odmeriavania zložiek MF pomocou byrety a odmernej banky (viď v podkapitole 4.2.1.) a ani predĺžením premytia kolóny MF na 24 hodín.



**Graf 12:** Zobrazenie nestability v retencii skúmaných analytov. Použitá MF: MF A = 25 mM AA v zmesi ACN:H<sub>2</sub>O v pomere 80:20. Použitá kolóna: Sequant ZIC-HILIC (100,0 mm × 2,1 mm, 3,5 μm, 100 Å; Merck).

## 6. Záver

Cieľom tejto diplomovej práce bolo popísanie retenčných vlastností katecholamínov (adrenalín, noradrenalín, dopamín) a ich prekursorov (L-DOPA, tyrozín) v rôznych HILIC podmienkach za použitia spektrofotometrickej a fluorimetrickej detekcie.

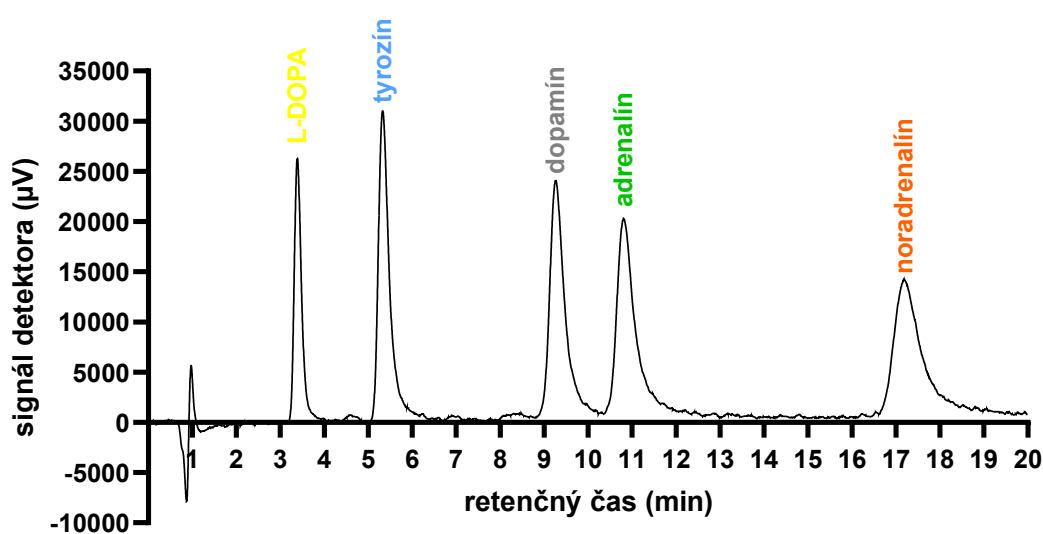
Na začiatku boli retenčné vlastnosti skúmaných analytov popísané na kolóne LUNA 3  $\mu$ m PFP(2). Skúmaním vplyvu % podielu ACN v MF vykazovala kolóna vďaka chemickému charakteru SF v nižších % organiky znaky RP-LC a vo vyšších % organiky naopak znaky HILIC separačného módu. Následný skrining vplyvu zvýšenia pH vodnej zložky MF na hodnotu 4,50 vykázal trend významného poklesu retencie katecholamínov v HILIC móde pri zvýšení pH vodnej zložky MF.

Ďalej bol skúmaný vplyv charakteru SF na retenciu katecholamínov a ich prekursorov na kolóne XBridge BEH Amide s neutrálnou SF a kolónach Avantor ACE HILIC-A a Sequant ZIC-HILIC, ktoré obsahujú SF s iónovými skupinami. Najvyššia retencia bola dosiahnutá na kolóne Sequant ZIC-HILIC.

Následne bol skúmaný vplyv zloženia MF a pH MF na kolóne Sequant ZIC-HILIC. Skúmané analyty vykazovali pri použití MF obsahujúcej kyselinu octovú ako aditívum vyššiu retenciu ako v prípade kyseliny mravčej. Zvyšovaním pH vodnej zložky MF za použitia kyseliny mravčej ako aditíva dochádzalo k zvyšovaniu retencie analytov, v prípade kyseliny octovej došlo k rozmytiu píkovo a zníženiu retencie. Vplyv zvýšenia pH vodnej zložky MF bol testovaný aj na kolóne Avantor ACE HILIC-A – zvýšením pH došlo aj v prípade tejto kolóny k zvýšeniu retencie.

Na záver bol vykonaný skrining vplyvu koncentrácie aditíva MF na retenčné správanie na kolónach XBridge BEH Amide a Sequant ZIC-HILIC. Na oboch testovaných kolónach došlo k trendu v podobe znižovania retencie skúmaných analytov so zvyšovaním koncentrácie aditíva.

Sekundárnym cieľom tejto diplomovej práce bola separácia všetkých 5 skúmaných analytov pomocou vhodnej chromatografickej metódy. Zo všetkých testovaných chromatografických podmienok v rámci tejto diplomovej práce sa podarilo separovať adrenalín, noradrenalín, dopamín, L-DOPA a tyrozín na kolóne Sequant ZIC-HILIC za použitia MF pozostávajúcej z 25 mM AA v zmesi ACN:H<sub>2</sub>O v pomere 80:20, ako možno vidieť na obrázku 9. Napriek tomu, že tieto chromatografické podmienky poskytovali prijateľný čas analýzy a dobrú separáciu analytov, tak pri opakovaných analýzách dochádzalo k nestabilite v retencii, a to najmä v prípade katecholamínov, čo znemožnilo opakovateľnosť výsledkov a možnosť validácie metódy.



**Obrázok 9:** Chromatogram získaný na kolóne Sequant ZIC-HILIC. Použitá MF: MF A = 25 mM AA v zmesi ACN:H<sub>2</sub>O v pomere 80:20. Použitá kolóna: Sequant ZIC-HILIC (100,0 mm × 2,1 mm, 3,5 µm, 100 Å; Merck).  
Prietoková rýchlosť: 0,4 ml/min. Teplota na kolóne: 35 °C. Spôsob detekcie: Fluorimetrická detekcia.  
Čas analýzy: 20 minút.

Výsledky uvedené v tejto diplomovej práci budú použité pre ďalší vývoj metódy pre stanovenie katecholamínov v placentе. Hlavným cieľom bude v prípade vývoja metódy v HILIC podmienkach objasnenie a odstránenie nestability v retencii na kolóne ZIC-HILIC, ktorá vykazuje sľubný potenciál.



## 7. Zoznam použitých skratiek

A – adrenalín

AA – kyselina octová

ACN – acetonitril

angl. – anglicky

APCI – chemická ionizácia za atmosférického tlaku

BEH – Bridge Ethylene Hybrid

CL – chemiluminiscenčný detektor

CNS – centrálny nervový systém

COMT – katechol-O-metyltransferáza

ČL – Český lékopis

D – dopamín

DP – diplomová práca

DPE – 1,2-difenyletylénamín

ECD – elektrochemický detektor

ESI – elektrosprejová ionizácia

FA – kyselina mravčia

FD – fluorimetrický detektor

FMOC-Cl – 9-fluorenylmetyloxykarbonyl chlorid

HILIC – chromatografia hydrofilných interakcií

HPLC – vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

HVA – homovanilová kyselina

IEX – Ion-Exchange Chromatography

IS – vnútorný štandard

LC-MS – spojenie kvapalinovej chromatografie a hmotnostnej spektrometrie

L-DOPA – L-dihydroxyfenylalanín

MAO – monoaminoxidáza

MF – mobilná fáza

$M_r$  – relatívna molekulová hmotnosť

MS – hmotnostná spektrometria

NA – noradrenalín

NP-LC – chromatografia na normálnych fázach

PFP - pentafluórofenyl

PNS – periférny nervový systém

RP-LC – chromatografia na reverzných fázach

SF – stacionárna fáza

SPE – extrakcia na pevnej fáze

UV-VIS – oblasť ultrafialového a viditeľného svetla

VMA – vanilmandľová kyselina

## 8. Zoznam použitej literatúry

1. RANG, H. P.; DALE, M. M. et al. *Rang and Dale's Pharmacology*. 7<sup>th</sup> edition, Elsevier, Edinburgh 2012. ISBN 13978-1-4377-1933-8
2. KOOLMAN, J.; RÖHM K. H. *Barevný atlas biochemie*. 1. české vyd., Grada Publishing, Praha 2012. ISBN 978-80-247-2977-0
3. *Český lékopis* 2017. 1. vyd., Grada Publishing, Praha 2017. ISBN 978-80-271-0500-7
4. ŠVIHOVEC, J. et al. *Farmakologie*. 1.vyd., Grada Publishing, Praha 2018. ISBN 978-80-247-5558-8
5. LINCOVÁ, D.; FARGHALI H. et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. dopl. a přeprac. vyd., Galén, Praha 2007. ISBN 978-80-7262-373-0
6. MURRAY, R. K. et al. *Harperova Biochemie*. 4. české vyd., H&H, Praha 2002. ISBN 80-7319-013-3
7. POKORNÝ, J. et al. *Přehled fyziologie člověka I. díl*. 3. přeprac. vyd., Karolinum, Praha 2001. ISBN 80-246-0229-6
8. LEDVINA, M. et al. *Biochemie pro studující medicíny I a II. díl*. 2. vyd., Karolinum, Praha 2009. ISBN 978-80-246-1414-4
9. SONNE, J. et al. *Dopamine* [Updated 2022 Jul 4]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535451/figure/article-20657.image.fl/>
10. DIETZEN, D. J.; BENNETT, M. J. et al. *Biochemical and Molecular Basis of Pediatric Disease*. 5<sup>th</sup> edition, Elsevier, London 2021. ISBN 978-0-12-8178962-8
11. 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
12. KAZAKEVICH, Y.; LO BRUTTO, R. *HPLC for pharmaceutical scientists*. John Wiley & Sons, 2007. ISBN 978-0-471-68162-5
13. SNYDER, L. R.; KIRKLAND J. J. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 2nd edition, John Wiley & Sons, 1979. ISBN 0-471-03822-9
14. NOVÁKOVÁ, L.; DOUŠA, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1. vyd., Lucie Nováková, Praha 2013. ISBN 978-80-260-4243-3
15. <https://mournetrainingservices.com/brief-guide-hplc/> [stiahnuté 26.3.2023].

16. WOOD, A. T.; HALL, M. R. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of catecholamines and indoleamines using a simple gradient solvent system and native fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, **2000**, 744, 221 – 225.
17. 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.
18. GROSU, L. et al. Twelve Catecholamines and Metabolites Efficient Separation. *Revista de Chimie (Bucharest)*, **2011**, 62 (9), 932 – 936.
19. ROZET, E. et al. Performances of a multidimensional on-line SPE-LC-ECD method for the determination of three major catecholamines in native human urine: Validation, risk and uncertainty assessments. *J. Chromatogr. B*, **2006**, 844, 251 – 260.
20. HEMSTRÖM, P.; IRGUM, K. Hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.*, **2006**, 29, 1784 – 1821.
21. 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.
22. CHIRITA, R. I. et al. Approach to hydrophilic interaction chromatography column selection: Application to neurotransmitters analysis. *J. Chromatogr. A*, **2010**, 1217, 3091 – 3104.
23. CHIRITA-TAMPU, R. I. et al. Optimisation of a hydrophilic interaction liquid chromatography method for catecholamines and related molecules analysis. *Sci. Study Res.*, **2017**, 18 (1), 031 – 041.
24. TAMPU, R. I. et al. Determination of catecholamines and related molecules in brain extract using a hydrophilic interaction liquid chromatography mass spectrometry method. *Sci. Study Res.*, **2020**, 21 (1), 059 – 069.
25. KUMAR, A. et al. Determination of catecholamines in urine using hydrophilic interaction chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218, 3854 – 3861.
26. 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.

27. KANAMORI, T. et al. Determination of catecholamines and related compounds in mouse urine using column-switching HPLC. *Analyst*, **2016**, 141, 2568 – 2573.
28. ZHANG, X. et al. Capillary hydrophilic interaction chromatography/mass spectrometry for simultaneous determination of multiple neurotransmitters in primate cerebral cortex. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2007**, 21, 3621 – 3628.
29. UEDA, E. et al. A semi-automated measurement of urinary catecholamines using high-speed ion-exchange column chromatography. *Clin. Chim. Acta*, **1977**, 80, 447 – 453.
30. 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.
31. HANSEN, S.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN K. *Introduction to Pharmaceutical chemical analysis*. 1<sup>st</sup> edition, John Wiley & Sons, 2012. ISBN 978-0-470-66121-5
32. FUKUSHIMA, T. et al. Enantiomeric Separation of *d*-/*l*-Norepinephrine and -Epinephrine by High-Performance Liquid Chromatography with  $\beta$ -Cyclodextrin Type Chiral Stationary Phase. *Biomed. Chromatogr.*, **1998**, 12, 1 – 3.
33. LV, H. et al. Analysis of endogenous epinephrine and norepinephrine enantiomers in rat plasma and application to a stereoselective pharmacokinetics. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2020**, 177, 112859.
34. BICKER, J. et al. Liquid chromatographic methods for the quantification of catecholamines and their metabolites in several biological samples – A review. *Anal. Chim. Acta*, **2013**, 768, 12-34.
35. SWARTZ, M. HPLC detectors: A brief review. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **2010**, 33, 1130 – 1150.
36. 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.
37. CHEN, S. et al. Analysis of 9-fluorenylmethyloxycarbonyl derivatives of catecholamines by high performance liquid chromatography, liquid chromatography/mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1999**, 13, 1869 – 1877.

38. ALBERTS, G. et al. Sensitive and specific method for the simultaneous determination of natural and synthetic catecholamines and 3,4-dihydroxyphenylglycol in microdialysis samples. *J. Chromatogr. B*, **1999**, 730, 213 – 219.
39. OKUMURA, T. et al. Study of salivary catecholamines using fully automated column-switching high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, **1997**, 694, 305 – 316.
40. YAMAGUCHI, M. et al. Simultaneous determination of urinary catecholamines and 5-hydroxyindoleamines by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analyst*, **1998**, 123, 307 – 311.
41. HIRANO, Y. et al. Rapid assay for catechol-O-methyltransferase activity by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, **2005**, 819, 41 – 46.
42. SMITH, E. A. et al. Measurement of urinary catecholamines in small samples for mice. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **2013**, 67, 45 – 49.
43. THOMAS, D. H. et al. Determination of free catecholamines in urine by tandem affinity/ion-pair chromatography and flow injection analysis. *Clin. Chim. Acta*, **2008**, 398, 63 – 69.
44. 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.
45. LI, W. et al. Development and validation of a semi-automated method for L-DOPA and dopamine in rat plasma using electrospray LC/MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2000**, 24, 325 – 333.
46. KUSHNIR, M. M. et al. Analysis of Catecholamines in Urine by Positive-Ion Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Clin. Chem.*, **2002**, 48:2, 323 – 331.
47. 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.
48. GÁMIZ-GRACIA, L. et al. Chemiluminescence detection in liquid chromatography: Applications to clinical, pharmaceutical, environmental and food analysis – A review. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 640, 7 – 28.

49. 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.
50. TSUNODA, M. et al. Catecholamine analysis with microcolumn LC-peroxyoxalate chemiluminescence reaction detection. *Clin. Chim. Acta*, **2006**, 366, 168 – 173.
51. 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, 386 – 392.
52. BELL, D. S.; JONES, A. D. Solute attributes and molecular interactions contributing to “U-shape” retention on a fluorinated high-performance liquid chromatography stationary phase. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1073, 99 – 109.
53. BELL, D. S. Retention and selectivity of stationary phases used in HILIC. *LCGC North Am.*, **2015**, 33, 90 – 101.
54. HOSSEINKHANI, F. et al. Systematic Evaluation of HILIC Stationary Phases for Global Metabolomics of Human Plasma. *Metabolites*, **2022**, 12, 165.
55. MCCALLEY, D. V. Study of the selectivity, retention mechanisms and performance of alternative silica-based stationary phases for separation of ionised solutes in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2010**, 1217, 3408 – 3417.
56. GRECO, G. et al. Study of the retention behaviour in zwitterionic hydrophilic interaction chromatography of isomeric hydroxy- and aminobenzoic acids. *J. Chromatogr. A*, **2012**, 1235, 60 – 67.
57. Dr. Machtejevas, E. Súkromná správa.
58. [https://www.norman-network.net/sites/default/files/files/Events/2015/NORMAN\\_Rhodes/Thomaidis\\_Norman\\_workshop\\_HILIC.pdf](https://www.norman-network.net/sites/default/files/files/Events/2015/NORMAN_Rhodes/Thomaidis_Norman_workshop_HILIC.pdf) [stiahnuté 20.4.2023]
59. KUMAR, A. et al. Practical investigation of the factors that affect the selectivity in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2013**, 1276, 33 – 46.
60. WEST, C.; AUROUX, E. Deconvoluting the effects of buffer salt concentration in hydrophilic chromatography on a zwitterionic stationary phase. *J. Chromatogr. A*, **2016**, 1461, 92 – 97.