UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Analýza vybraných polárních látek v HILIC módu

Diplomová práce

Hradec Králové 2010 Anna Brychová

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 řádně citovány.

V Hradci Králové dne 14. 5. 2010 …….

Anna Brychová

Tato diplomová práce vznikla za podpory grantu SVV-2010-261-001.

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí diplomové práce PharmDr. Petře Kovaříkové Ph.D. za trpělivost, odborné vedení a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé diplomové práce.

ABSTRAKT

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je v dnešní době nejvýznamnější a nejpoužívanější separační metoda, která umožňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu směsi látek. Jednou z jejích variant je hydrofilní interakční kapalinová chromatografie. Tato technika zažívá v poslední době stále větší rozmach, hlavně díky svým přednostem, mezi než patří možnost analýzy velmi polárních a hydrofilních sloučenin.

Přesně takovými sloučeninami jsou i adeninribonukleotidy (ATP, ADP, AMP, cAMP), kreatin a fosfokreatin. Význam těchto látek je obrovský a to nejen v lidském organismu. Bylo provedeno a publikováno mnoho metod stanovení těchto polárních látek, kde dominuje HPLC stanovení za použití kolon reverzní fáze. Jejich základní přehled je součástí této diplomové práce.

V experimentální části tato diplomová práce popisuje postup vývoje vhodných chromatografických podmínek, které by umožnily separaci ATP, ADP, AMP, cAMP, kreatinu a fosfokreatinu a případně i jejich kvantitativní hodnocení v HILIC módu. Nejlepší separace bylo dosaženo na koloně ZIC®-HILIC (150 x 2,1 mm; 3,5 μm; 200 Å) s použitím dvousložkové mobilní fáze a gradientové eluce. Mobilní fáze se skládala ze složky A, kterou byl 2 mM mravenčanový pufr, pH 6,45 a složky B – směsi (90% acetonitril, 2 mM mravenčanový pufr). UV detekce byla prováděna při vlnových délkách 254 nm pro ATP, ADP, AMP, cAMP a při 220 nm pro C a PC.

ABSTRACT

Nowadays High Pressure Liquid Chromatography is the most important and the most frequently used separation technique that enables qualitative and quantitative analysis of the complex mixtures. One of its variants is Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. Lately this technique has experienced an increasing boom particularly, due to its ability to improve separation of very polar and hydrophilic compounds.

The adeninribonucleotides (ATP, ADP, AMP, cAMP), creatine and phosphoceratine are among these highly polar compounds that are of great importance not only for human body. Number of analytical methods has been developed and published for the analysis of these compounds; however HPLC methods using the reverse phases have been dominated. The basic overview of these methods is a part of this diploma thesis.

The experimental part of this thesis is focused on the development of chromatographic conditions suitable for the simultaneous analysis of ATP, ADP, AMP, cAMP, creatine and phosphocreatine in HILIC mode. The best separation was achieved on ZIC®-HILIC (150 x 2,1 mm; 3,5 μm; 200 Å) column using a binary mobile phase and gradient elution. The mobile phase consisted of the A component (2 mM ammonium formate, pH 6,45) and the B component (90% of acetonitrile, 2 mM ammonioum formate) that were mixed together. The UV detection was performed at the wavelengths of 254 nm for ATP, ADP, AMP, cAMP and at 220 nm for C and PC.

OBSAH DIPLOMOVÉ PRÁCE:

1 ÚVOD 7

2 TEORETICKÁ ČÁST 8

2.1 HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) 9
2.1.1 Princip HPLC 9
2.1.2 Zařízení pro HPLC analýzu 11
2.1.2.1 Zásobníky mobilních fází 11
2.1.2.2 Čerpadla (vysokotlaké pumpy) 11
2.1.2.3 Dávkovací zařízení 12
2.1.2.4 Kolony 12
2.1.2.5 Detektory 13
2.2 HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) 18
2.2.1 Mechanismus separace 18
2.2.2 Vhodné mobilní fáze 20
2.2.3 Typy stacionárních fází používaných v HILIC 21
ZIC®-HILIC kolona 23
OBELISC N kolona 24
2.2.4 Využití HILIC 27
2.3 Stanovované látky 28
2.3.1 Adenosin-5´-trifosfát = ATP 29
2.3.2 Adenosin-5´-difosfát = ADP 31
2.3.3 Adenosinmonofosfát = AMP 32
2.3.4 Cyklický adenosin-3´,5´-monofosfát = cAMP 33
2.3.5 Kreatin 34
2.3.6 Fosfokreatin = kreatinfosfát 35
2.4 Přehled vybraných analytických metod pro stanovení adeninribo-nukleotidů, kreatinu a fosfokreatinu 36

3 CÍL PRÁCE 40

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 41

4.1 Použité chemikálie 42
4.2 Přístrojové vybavení 43
4.2.1 Chromatografický systém 43
4.2.2 Ostatní použité přístroje 43
4.3 Vývoj chromatografických podmínek 44
4.3.1 Optimalizace složení mobilní fáze 44
4.3.2 Výběr vhodné vlnové délky pro UV detekci 46
4.3.3 Další chromatografické podmínky 46
4.3.4 Příprava mobilní fáze 46
4.3.5 Příprava roztoků standardů 47

5 VÝSLEDKY A DISKUZE 48

5.1 Vývoj chromatografických podmínek pro analýzu ATP, ADP, AMP, cAMP, C, PC – analýza na koloně Obelisc N 49
5.2 Vývoj chromatografických podmínek pro analýzu ATP, ADP, AMP, cAMP, C, PC – analýza na koloně ZIC®-HILIC 49
5.2.1 Závislost retenčních časů a tvarů píků stanovovaných látek na zvyšování procentuelního zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi 49
5.2.2 Závislost retenčních časů a tvarů píků stanovovaných látek na zvyšování pH pufru mobilní fáze 50
5.2.3 Závislost retenčních časů a tvarů píků stanovovaných látek na změně síly pufru mobilní fáze 50
5.3 Konkrétní postup při vývoji chromatografických podmínek v HILIC módu 51

6 ZÁVĚR 66

1 ÚVOD

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie patří v dnešní době mezi nejpoužívanější a nejprogresivnější separační techniky. Velmi významné je její použití v oblasti analýzy léčiv, kde umožňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu celé řady léčiv, metabolitů i příbuzných látek.

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC) je takovou variantou HPLC, kdy stacionární fáze je silně polární a mobilní fáze je tvořená směsí organického rozpouštědla a vodné složky, kde je organické rozpouštědlo zastoupeno v nadbytku a voda je silnějším elučním činidlem. K separaci dochází vlivem rozdělování látky mezi tyto dvě fáze přičemž platí, že čím více je látka hydrofilní, tím více je na stacionární fázi zadržována. Dodnes ale nebyl zcela objasněn přesný mechanismus HILIC. Výhodou této metody je možnost separace i velmi polárních a hydrofilních sloučenin, pro které není vhodné reverzní uspořádání HPLC.

Stanovované látky – adeninribonukleotidy, kreatin a fosfokreatin mají velký význam pro lidský organismus. Podílí se na řízení celé řady metabolických procesů. V poslední době bylo provedeno mnoho studií zaměřených na stanovení množství těchto látek za patologických stavů lidského organismu, jako je např. akutní infarkt myokardu, mozková ischémie a další. Žádná z těchto analýz ale nebyla dosud provedena v HILIC módu.

V teoretické časti této diplomové práce je stručně popsána problematika HPLC, HPLC aparatura, dále princip HILIC, přehled stacionárních fází pro HILIC, základní informace o významu a možném využití stanovovaných látek a na závěr je zařazen stručný souhrn metod, které již byly aplikovány pro separaci těchto látek.

Druhou část diplomové práce tvoří experimentální část, která popisuje konkrétní postup vývoje chromatografických podmínek vhodných k současnému stanovení ATP, ADP, AMP, cAMP, C a PC včetně způsobu přípravy roztoků standardů a ucelený přehled zkoušených chromatografických podmínek.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je chromatografická analytická metoda, která v poslední době zažívá stále větší rozmach a uplatnění, a to především v oblasti analýzy léčiv. Slouží k separaci a analýze složitých směsí látek, včetně látek tepelně nestálých, netěkavých a polárních, které bývají těžko analyzovatelné příbuznou plynovou chromatografií[1,2].

Vysoká účinnost oproti obyčejné chromatografii spočívá ve výrazném zmenšení rozměrů kolony, průtoku mobilní fáze, snížení potřebného množství mobilní fáze a zkrácení času nutného pro analýzu. Toho je dosaženo zmenšením zrnění stacionární fáze a rozptylu v zrnění. Tato vylepšení mají ale za následek zhoršení snadnosti průtoku mobilní fáze skrz fázi stacionární a proto je nutné pracovat za vysokých tlaků[3,4].

Mezi další výhody, jimiž HPLC vyniká oproti ostatním separačním metodám, patří:

- možnost kvantitativní i kvalitativní analýzy,
- vysoká přesnost a citlivost,
- reprodukovatelnost,
- potřeba minimálního množství vzorku,
- možnost automatizace a následné realizace analýz bez obsluhy příslušného pracovníka[2].

2.1.1 Princip HPLC

Při HPLC dochází k separačnímu procesu, který je založen na dělení stanovované látky mezi stacionární fázi, jenž je umístěna v koloně a je nepohyblivá, a mezi mobilní fázi, která touto kolonou protéká[1].

Během vlastní separace dochází k mnoha typům interakcí. Konkrétně se zde uplatňují interakce analytů s mobilní fází, interakce mobilní fáze se stacionární fází a sorpce analytů na stacionární fázi[3].

V HPLC rozeznáváme dva typy možného uspořádání fází. Za prvé se jedná o takzvané normální uspořádání, při kterém je stacionární fáze polární a mobilní fáze je nepolární. Tento typ je vhodný pro separaci směsí látek, které jsou polární. Opakem je

tzv. reverzní uspořádání HPLC (systém obrácených fází), které je vhodné pro separace nepolárních látek. Polarita fází je zde opačná, tedy stacionární fáze je nepolární a mobilní fáze je polární[1,5].

Chromatografie na systémech s obrácenými fázemi se týká asi 80 % všech aplikací HPLC.

Kapalinovou chromatografii lze rozdělit podle typu stacionární fáze a podle typu separačního mechanismu, který se při analýze uplatňuje:

a) adsorpční chromatografie – stacionární fáze je adsorbent,
b) iontová chromatografie – stacionární fáze je ionex (měnič iontů),
c) gelová (filtrační) chromatografie – stacionární fáze je neionizovaný přírodní nebo syntetický gel,
d) afinitní chromatografie – stacionární fáze obsahuje zakotvené ligandy, na které se rozdělovaná látka váže[1].

Další možné dělení je podle podmínek, za kterých chromatografie probíhá:

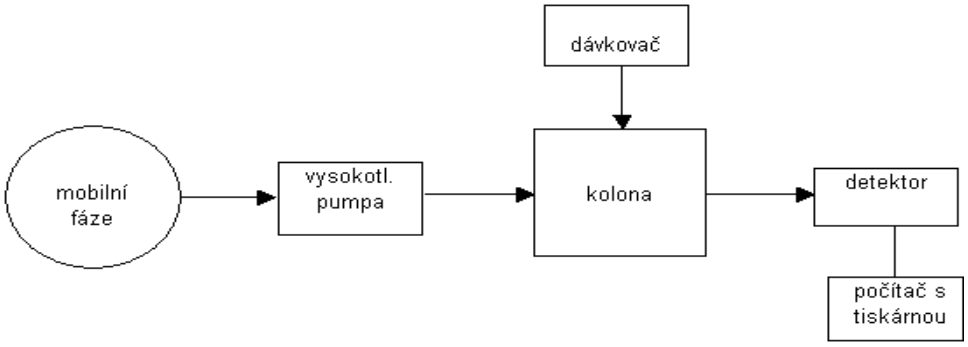
a) izokratická eluce – konstantní podmínky v průběhu celé analýzy,
b) gradientová eluce – mění se podmínky v průběhu analýzy, např. teplota nebo složení mobilní fáze[2,5].

Výstupem HPLC je záznam ve formě chromatografického píku, který značí danou látku. Pro každý pík je charakteristický retenční čas, jedná se tedy o kvalitativní výstup analýzy látky. Jako kvantitativní vyhodnocení se pak používá plocha píku, která odpovídá množství látky ve vzorku. V případě, kdy se na kolonu nastřikuje směs látek, je požadováno, aby byly výsledné píky zřetelně oddělené, pokud možno až na základní linii, symetrické a ostré – toto můžeme ovlivnit úpravou chromatografických podmínek[2].

2.1.2 Zařízení pro HPLC analýzu

Kapalinový chromatograf (na Obr. 1) se skládá z následujícího:

- vysokotlaká pumpa,
- dávkovač vzorku,
- chromatografická kolona,
- detektor, popř. sběrač frakcí[2,6].



Obr. 1: Kapalinový chromatograf.

2.1.2.1 Zásobníky mobilních fází

Zásobníky jsou většinou tvořené skleněnými lahvemi, do kterých zasahuje čerpací hadička (často také opatřena skleněnou fritou).

Mobilní fázi je potřeba před použitím zfiltrovat, aby byly odstraněny případné nečistoty, které by mohly působit rušivě, v horším případě i „ucpat“ systém. Mobilní fáze musí být také odplyněna, např. s použitím ultrazvukové lázně[7]. Většina moderních HPLC sestav má zabudovaný odplyňovač, tzv. degasser.

2.1.2.2 Čerpadla (vysokotlaké pumpy)

Vysokotlaká pumpa je velmi důležitou součástí systému pro HPLC. Vzhledem k mikroskopické náplni kolon je při průchodu mobilní fáze kladen vysoký odpor, který je potřeba nějak překonat. Z toho důvodu musí být mobilní fáze čerpána pod vysokým

tlakem, aby mohla protéct přes kolonu, přičemž čerpadlo musí zajistit konstantní tok mobilní fáze až při tlacích ve výši 40Mpa[1].

Čerpadla jsou nejčastěji vyrobena z nerezové oceli, titanu nebo jsou keramická. Je možné je rozdělit na pulzní a bezpulzní; membránová a pístově membránová[8].

V kapalinové chromatografii se využívá dvou módů čerpání mobilních fází (viz výše):

- izokratický mód
  - při kterém je za stálého průtoku čerpána jedna mobilní fáze (jednosložková nebo vícesložková, ale již předem smíchaná),
  - tento typ je vhodný pro dělení směsi látek, jejichž eluční parametry se vzájemně příliš neliší,
- gradientový mód
  - při kterém lze v průběhu jedné analýzy programově měnit složení i průtok mobilní fáze
  - tento typ je naopak vhodný pro dělení směsi látek, kdy se její jednotlivé složky vzájemně liší v svými elučními parametry[1,8].

2.1.2.3 Dávkovací zařízení

Dávkování vzorku lze provést jednoduchou injekční mikrostříkačkou nebo se používají dávkovací vysokotlaké ventily se smyčkou[1]. Většina v dnešní době používaných HPLC sestav je již vybavena automatickými dávkovači vzorku – autosamplery.

2.1.2.4 Kolony

Kolony používané pro HPLC musí být vyrobeny z dostatečně odolných materiálů a to jak vůči vysokým pracovním tlakům, tak zároveň vůči chemickému působení mobilních fází a separovaných složek. Takto odolným materiálem je např. antikorozivní ocel nebo specielně tvrzené borosilikátové sklo[7].

Nejčastěji se používají kolony dlouhé 5 – 30 cm o vnitřním průměru 3 – 5 mm. Náplň je tvořena vhodným sorbentem o velikosti částic nejčastěji 3 – 5 μm. Jsou kladeny vysoké požadavky na to, aby byla náplň kolony homogenní a rovnoměrná[1].

Mezi vhodné sorbenty patří především tzv. chemické vázané stacionární fáze:

- silikagel s uhlovodíkovými řetězci, které obsahují zpravidla 18 nebo 8 uhlíkových atomů = nepolární chemicky vázané fáze, reverzní fáze;
- silikagel s tříuhlíkatým řetězcem zakončený skupinami $–NH_2$, -CN = středně polární fáze;
- čistý silikagel a oxid hlinitý = polární sorbenty;
- ionexy pro potřeby iontově výměnné chromatografie[2].

Vzhledem k rozměrům používaných kolon platí, že účinnost separace, doba analýzy a pracovní tlak se zvyšují s rostoucí délkou kolony a naopak klesají s rostoucím průměrem částic náplně[7].

2.1.2.5 Detektory

Existuje mnoho různých detektorů, které se liší principem způsobu detekce, konstrukcí, selektivitou, citlivostí a lineárním dynamickým rozsahem.

Většina dnes používaných detektorů jsou detektory koncentrační. Je možné je rozdělit do dvou skupin:

- ***selektivní detektory*** – jejichž signál je úměrný pouze koncentraci detekované komponenty v eluentu,
- ***univerzální detektory*** – jejichž signál je úměrný celkové vlastnosti eluentu jako celku, tj. mobilní fázi a detekované komponenty[8].

Na detektory jsou kladeny základní požadavky, které by měly splňovat, mezi ně patří:

- možnost detekce všech přítomných komponent (univerzálnost),
- odezva detektoru by měla být okamžitá a lineární v co nejširším koncentračním rozmezí stanovované látky (široký lineárně dynamický rozsah),
- reprodukovatelnost,
- vysoká citlivost a nízká úroveň šumu,

- jednoduchost a spolehlivost,
- odolnost vůči změnám tlaku, průtoku, složení a teplotě mobilní fáze,
- design detekční cely, který zamezí opětovnému smísení dělených analytů,
- možnost užití gradientové eluce,
- nízký mrtvý objem,
- nedestruktivnost [1,8,9].

Vlastní výběr vhodného detektoru pak závisí na konkrétní aplikaci a na vlastnostech analytu. Mezi často používané detektory patří spektrofotometrický (UV-VIS) a fluorescenční. Podmínkou použití těchto detektorů je, aby daný analyt absorboval záření určité vlnové délky (UV-VIS detekce) anebo aby emitoval fluorescenční záření (fluorescenční detekce). Pokud analyt sám o sobě neabsorbuje záření v oblasti UV-VIS nebo neemituje fluorescenční záření, je použití těchto detektorů podmíněno derivatizací vzorku (vzorek je chemickou reakcí převeden na sloučeniny, které vykazují potřebné vlastnosti – absorpce UV-VIS, fluorescence)[10].

a) **Spektrofotometrické detektory**

- nejčastější, lze je použít až pro 80% HPLC aplikací,
- proměřují absorbanci elektromagnetického záření určité vlnové délky složkami eluátu,
- k detekci se používá především UV oblast spektra – UV detektory,
event. UV-VIS detektory,
- mají značnou citlivost: 10^{-9} až 10^{-10} g/ml a lze je používat při gradientové eluci[2].

Kvantitativní vyhodnocení je založeno na Lambert-Beerově zákoně: $A = \varepsilon . c . l$

l ... tloušťka absorbující vrstvy

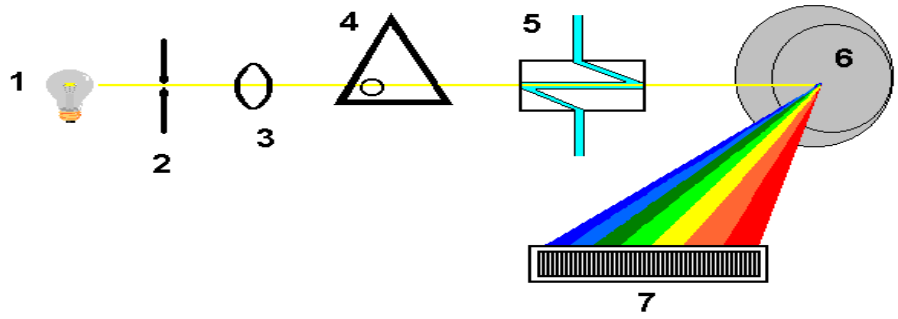
c ... koncentrace absorbující složky

ε ... molární absorpční koeficient

Podle konstrukčního typu se mohou spektrofotometrické detektory rozdělit na pět typů (první dva typy se v dnešní době pro analytické aplikace již nepoužívají):

- **Detektory s fixní vlnovou délkou** (nejčastěji 253,7 nm), používají jako zdroje záření nízkotlakou rtuťovou výbojku[2].
- **Detektory s měnitelnou vlnovou délkou**, a to pouze předem danými vlnovými délkami[2].

- **Detektory s programovatelnou vlnovou délkou**, vlnovou délku lze nastavovat v určitém rozmezí, nejčastěji od 190 do 700 nm. Vlnová délka je měnitelná během analýzy. Nevýhodou je však poněkud nižší citlivost ve srovnání s detektory s fixní vlnovou délkou[2].
- **Skenující detektory** dokáží snímat spektra látek v měrné cele při zastaveném průtoku mobilní fáze.
- **Detektory diodového pole (PDA, DAD)**, umožňují získat spektrální data látek v průběhu celé analýzy. Výsledkem je trojrozměrný záznam[2].
  Základní schéma tohoto typu detektoru je na Obr. 2.



Obr. 2: Schéma detektoru s diodovým polem.
(1 – zdroj záření, 2 – štěrbina, 3 – čočka, 4 – clona, 5 – měrná cela detektoru, 6 – holografická mřížka, 7 – fotodiody)

Spektrální rozlišení je dáno počtem diod na poli, který se pohybuje od 512 do 1024 diod. Tyto detektory umožňují ve spolupráci s počítačem detekci látky při jakékoliv zvolené vlnové délce, umožňují porovnávat snímaná spektra s knihovnou spekter, vypočítají čistotu píku (identifikace látky)[8].
Použití DAD je podmíněno softwarovým zázemím, které umožňuje např. průběžné hodnocení čistoty píků, identifikaci neznámých složek pomocí spektrální knihovny, rychlé stanovení absorpčního maxima látky, kvantifikaci píků s odlišnými spektrálními vlastnostmi v jedné analýze[7].

b) **Fluorescenční detektory**

- tyto detektory jsou selektivní a mají vysokou citlivost 10^{-9} až 10^{-12} g/ml (jsou citlivější než UV detektory),
- jejich použití je výhodné pokud analyt vykazuje fluorescenci,
- při měření fluorescence se budící UV záření ze zdroje vede do průtokové cely, kde je absorbováno analytem a dojde k vyzáření světelného kvanta o větší vlnové délce[2,7].

c) **Elektrochemické detektory**

- elektrochemické detektory umožňují stanovit velmi nízké koncentrace analytů v eluentu v případě, že tyto látky jsou elektrochemicky aktivní (redukovatelné nebo oxidovatelné)[7],
- proměřují elektrochemickou veličinu, jejíž hodnota je závislá na koncentraci analyzovaného léčiva,
- jejich nevýhodou je nevhodnost použití při gradientové eluci[2],
- příkladem těchto detektorů je detektor amperometrický a coulometrický[8].

d) **Refraktometrické detektory**

- mají nižší citlivost ve srovnání s UV-VIS detektory,
- měří rozdílný index lomu mezi čistou mobilní fází a eluátem obsahujícím analyzovanou látku, který vytéká z kolony[2],
- detektor je tím citlivější, čím větší je rozdíl mezi indexem lomu rozpouštědla a analytem
- jeho nevýhodou je to, že nelze použít při gradientové eluci a také to, že index lomu je závislý na teplotě[11].

e) **Vodivostní detektory**

- patří mezi univerzální typ detektoru[8],
- měří elektrickou vodivost eluátu vytékajícího z kolony dvěma elektrodami (nerez, zlato, platina) umístěnými v průtokové cele,
- tyto detektory jsou vhodné pro detekci iontů.

f) **Hmotnostní detekce**

- snímání hmotnostního spektra během eluce látek je velmi výhodné pro strukturní analýzu a identifikaci látek ve složitých směsích[7],
- tento způsob detekce je vysoce citlivý a univerzální.

2.2 HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)

= hydrofilní interakční kapalinová chromatografie

Jedná se o chromatografickou separační techniku, při které analyty reagují s hydrofilní stacionární fází a jsou vymývány relativně hydrofobní dvousložkovou mobilní fází, ve které je voda silnějším elučním činidlem. Tento druh separace je v HPLC používán od roku 1975, a to zejména pro analýzy cukrů a oligosacharidů[12,13].

Pojem HILIC, který navrhl Alpert, byl však poprvé použit až v roce 1990[14].

Ačkoliv je použití této techniky relativně omezené, pouze pro analýzy velmi polárních a hydrofilních sloučenin, v posledních letech můžeme pozorovat náhlé zvýšení její oblíbenosti podpořené potřebou analyzovat polární sloučeniny ve stále větších komplexnějších směsích[14].

Metoda je v základě podobná tradiční kapalinové chromatografii na normální fázi (ale s tím důležitým rozdílem, že používá směs vody a s vodou mísitelného organického rozpouštědla, nejčastěji acetonitrilu jako mobilní fázi). Její výhodou oproti jiným separačním chromatografickým metodám, je právě možnost separace velmi polárních a hydrofilních sloučenin, pro které není vzhledem k malé retenci vhodné reverzní uspořádání HPLC[15].

2.2.1 Mechanismus separace

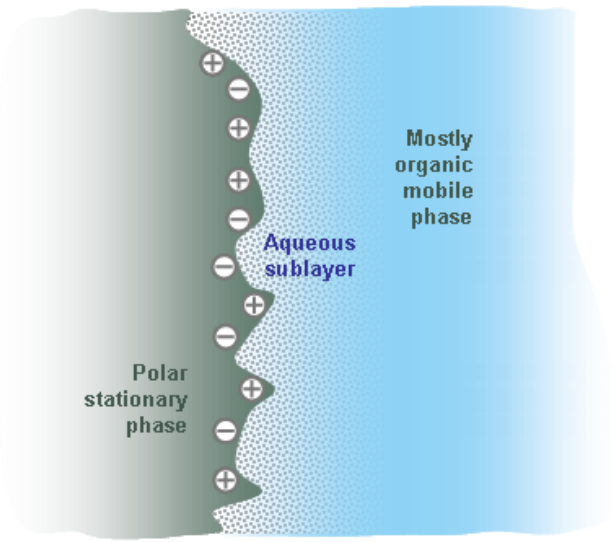
I když bylo publikováno mnoho, převážně zahraničních studií, které se blíže zabývaly studiem mechanismu separace v HILIC[14], přesný mechanismus nebyl dosud detailně objasněn.

Rozdíl mezi HILIC a kapalinovou chromatografií na normální fázi byl již dávno diskutován. Dle Alpertovi definice, by měl být termín HILIC používán pouze tehdy, je-li silným eluentem voda a retenční mechanismus se děje rozdělováním[16]. Zatímco retence při klasické kapalinové chromatografii na normální fázi se řídí převážně povrchovou adsorpcí[14].

Obecně lze říci, že látka je zpravidla tím více zadržována, čím více je hydrofilní. Retence se tedy zvyšuje s rostoucí polaritou analyzované látky nebo směsi a naopak se snižuje se zvýšením polarity mobilní fáze (klesá s rostoucím podílem vody nebo pufru).

Retenční mechanismus je možné vysvětlit jako rozdělování látky mezi na vodu bohatší stacionární fázi a na vodu chudší mobilní fázi. Primární funkcí stacionární fáze je tedy vázat a přenášet vodu[8,15,17].

Při HILIC dochází k separaci v koloně vlivem hydrofilní interakce mezi zakotvenou stacionární fází a separovanými látkami. Jedná se o tzv. primární interakci. Předpokládá se, že k tomu, aby mohlo k hydrofilní interakci dojít je potřeba, aby se na povrchu sorbentu stacionární fáze vytvořila hydratovaná vrstva (water-rich layer – viz Obr. 3)[17].



Obr. 3: Povrch stacionární fáze při HILIC metodách.

V průběhu separace se ovšem uplatňují i druhotné interakce. Mezi druhotné interakce patří např. elektrostatické síly, které rovněž ovlivňují retenci na stacionární fází (v tomto případě se jedná o nabité stacionární fáze). Faktory, které řídící retenci jsou tedy i vodíkové vazby a interakce typu dipól-dipól (závislé na dipólovém momentu a polarizovatelnosti látky rozpuštěné v roztoku)[15,17].

K HILIC separacím se používají polární stacionární fáze a vodné mobilní fáze, které obsahují vysoký podíl organického rozpouštědla. Stacionární fáze musí být

polárnější než fáze mobilní. Díky tomuto uspořádání je možné s vysokým rozlišením dělit polární analyty, přičemž nepolární látky, které nevykazují afinitu ke stacionární fázi, nejsou zadržovány[17].

2.2.2 Vhodné mobilní fáze

Teoreticky je možné použít jako mobilní fáze všechny vodno-organické fáze, ale preferuje se především acetonitril, který má malou viskozitu a tím je zajištěna vysoká účinnost separace a nízký tlak na chromatografické koloně[8].

Typická mobilní fáze se tedy skládá ze 40-97% acetonitrilu ve vodě nebo v těkavém pufru[3,15]. Vzhledem k tomu, že mobilní fáze obsahuje tak velký podíl organického rozpouštědla je velmi snadno odpařitelná a velmi výhodné je tak spojení HILIC s MS detekcí.

V některých pracích byly popsány analýzy za užití jiného eluentu než acetonitrilu, např. methanolu. Ten se však ukázal být příliš silným elučním činidlem a navíc při jeho použití docházelo k rozšiřování chromatografických píků. Změny v selektivitě ale byly minimální. Byly provedeny také analýzy za použití alkoholů jako slabších eluentů, přičemž bylo zjištěno, že by mohly nalézt uplatnění pouze v případě, kdy je analyt nerozpustný v acetonitrilu[14].

Na rozdíl od ostatních chromatografických technik je část mobilní fáze nedílnou součástí stacionární fáze, proto je velmi důležité udržovat i koncentraci vody v eluentu v určitých mezích – vodná část by měla zaujímat 3-60%[15]. Určitá přítomnost vody v mobilní fázi je nutná také z toho důvodu, že kdyby mobilní fáze obsahovala pouze organické rozpouštědlo a koncentrace vody byla nulová, jednalo by se o kapalinovou chromatografii na normální fázi (NPLC), nikoliv o hydrofilní interakční kapalinovou chromatografii[17].

V případě, že se při separaci na koloně uplatňuje mechanismus iontové výměny, pak je zapotřebí použít k ovlivnění retence pufrované mobilní fáze, přičemž platí, že se zvyšováním koncentrace soli postupně klesá retence a stoupá doba ekvilibrace kolony[8].

Vyšší koncentrace pufru v mobilní fázi mohou negativně ovlivňovat citlivost MS detekce[15]. Přičemž právě spojení MS-HPLC v HILIC je velmi výhodné.

2.2.3 Typy stacionárních fází používaných v HILIC

V poslední době vzrůstá počet komerčně dostupných kolon určených speciálně pro HILIC, avšak vzájemně se příliš neliší typem použité stacionární fáze[14]. Podmínkou stacionární fáze používané v HILIC je to, aby byla více polární než použitá mobilní fáze. Velmi často je také nabitá, minimálně v nějakém rozmezí pH stupnice[15].

Výběr vhodné separační kolony je závislý na sloučenině nebo směsi sloučenin, které mají být separovány/analyzovány. V této diplomové práci byly použity dva typy kolon, Obelisc N a ZIC®-HILIC, podrobněji o nich bude pojednáno u příslušného typu stacionární fáze, kterou obsahují.

Vzhledem k tomu, že je většina HILIC kolon založena na silikagelu, netoleruje prostředí s vysokým pH. Vhodné pH rozmezí je obvykle 3 – 8 pro kolony na bázi silikagelu, a pH 2 – 10 je doporučováno pro polymerní kolony[15].

Zjednodušeně můžeme rozdělit stacionární fáze dle jejich náboje a to na nabité a neutrální. Nabité stacionární fáze přináší nový rozměr v selektivitě díky elektrostatickým interakcím s analyzovanou látkou, jak již bylo zmíněno výše. Stinnou stránkou těchto elektrostatických interakcí je potřeba soli nebo pufru v mobilní fázi k jejich přerušení při vymývání vzorku analyzované látky. Koncentrace soli/pufru však nesmí být příliš vysoká z důvodu zmíněného výše (negativní ovlivnění citlivosti MS detekce). Naopak neutrální stacionární fáze typicky požadují nízké koncentrace pufru[15].

Iontová síla i pH mobilní fáze má vliv na hustotu náboje slabých ionexů používaných jako stacionární fáze v HILIC (silikagel a aminové fáze). Oproti tomu při používání na pH nezávislých materiálů (např. zwitteriontové fáze) se optimalizace mobilní fáze řídí pouze nároky stanovované látky[15].

Stacionární fáze vhodné pro HILIC uspořádání se většinou skládají z čistého silikagelu a nebo ze silikagelu, který je dále modifikován.

Stacionární fáze tvořené čistým silikagelem jsou stále hojně užívány. Jejich nevýhodou je však snadná deaktivace silikagelu vodou přítomnou v mobilní fázi,

přesáhne-li určitý podíl. Čistý silikagel je také náchylný k ireverzibilní chemické adsorpci[14].

V analýzách se proto stále častěji užívá modifikovaný silikagel. Ten může mít na svém povrchu navázány různé skupiny: *aminové* (-NH_2), *amidové* (-$CONH_2$), *kyanové* (-CN), *diolové* (-CH(OH)-CH_2-OH) funkční skupiny nebo *hydrofilní polymery* (např. poly(hydroxyethyl))[17].

Silikagel s navázanými aminovými skupinami. Tato stacionární fáze je používána pro separace sacharidů v HILIC módu[14].

Silikagel s amidovými skupinami. Amidová skupina je méně reaktivní než aminová a postrádá její bazicitu. Retence na těchto kolonách, resp. stacionárních fázích, je tedy méně citlivá k pH mobilní fáze a méně náchylná k ireverzibilní chemické adsorpci[14].

Silikagel s kyanovými skupinami se v poslední době užívá pouze v několika aplikacích v HILIC separacích[18]. Ačkoliv je tato fáze obvykle označována jako polární, nepřítomnost donorové vodíkové vazby[19] způsobuje nízkou retenci na tomto modifikovaném silikagelu při normálním uspořádání a tak nalézá využití spíše v módu reverzního uspořádání[14].

Silikagel s diolovými skupinami je většinou používán pro separace proteinů. V celkové polaritě se tato fáze nejvíce podobá čistému silikagelu[19,20].

Existují také sorbenty s chemicky vázanými jednotkami oligosacharidů[21].

Silikagel s cyklodextriny obsahuje cyklické oligosacharidy složené z pěti a více 1→4 spojených α,D-glukopyranosidových jednotek. Přirozeně vyskytující se cyklodextriny začínají na 6 jednotkách glukózy. Z opticky aktivních cukrů se vytváří kavity[14]. Cyklodextriny mají také chirální vlastnosti a proto jsou využívány jako chirální selektory v mnoha oblastech separací[22].

V HILIC se používají i stacionární fáze jejichž základ není tvořen silikagelem, ale organickým polymerem. Jejich výhoda oproti silikagelovým fázím je snášenlivost většího pH rozmezí při analýzách (většinou pH 2 – 10). Polymer bývá dále také modifikován, příkladem je **polymer s aminovými skupinami**. Tento typ stacionární fáze má ve srovnání se stejnou modifikací silikagelu lepší stabilitu[23]. Může být používána za podmínek kyselých i bazických a je použitelná v separacích typu HILIC[14].

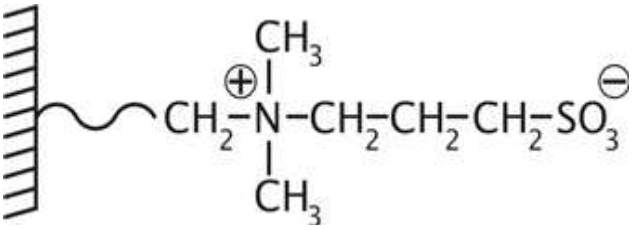
Novinkou mezi stacionárními fázemi pro HILIC jsou tzv. **zwitteriontové stacionární fáze**, které se vyznačují vysokou polaritou a vysokou afinitou k vodě[24,25].

V této diplomové práci byla použita kolona ZIC®-HILIC, která obsahuje daný typ stacionární fáze.

ZIC®-HILIC kolona

ZIC®-HILIC kolona obsahuje jako stacionární fází porézní silikagel, na nějž je kovalentně navázaná zwitterionická funkční skupina. Konkrétně se jedná o funkční sulfobetainovou skupinu (viz Obr. 4), která má amfoterní (zwitterionický) charakter. Ačkoliv obsahuje náboj, celkově je elektricky neutrální[26].

Tato funkční skupina zaručuje vyšší stabilitu a robustnější HILIC separaci, než konvenční fáze silikagelu nebo amino fáze[27].



Obr. 4: Sulfobetainová zwitterionická funkční skupina.

Slabé elektrostatické interakce mezi nabitými analyty a neutrální stacionární fází mají za následek jedinečnou selektivitu. Tento typ kolon je zvláště vhodný pro analyty, které jsou jen slabě zadržovány na kolonách s reverzní fází[28].

Mobilní fáze používaná při analýze v HILIC módu, by měla obsahovat vysoký podíl (50-95%) organických rozpouštědel (např. acetonitril) ve směsi s vodným pufrem v různém poměru.

Vhodné pufry pro HILIC separaci jsou mravenčanový a octanový pufr, a to kvůli jejich výborné rozpustnosti dokonce i ve velmi vysokých koncentrací organických rozpouštědel. A také díky jejich těkavosti, což je velmi výhodné ve spojení s MS detekcí. Je dobré se vyvarovat použití fosforečnanového pufru a dalších pufrů s nízkou rozpustností, aby se předešlo jejich vysrážení na koloně. Koncentrace pufru

v rozmezí 5 – 20 mM je doporučována pro separaci většiny sloučenin, s horní mezí 200 – 300 mM, v závislosti na rozpustnosti v mobilní fázi[28].

Jako u jiných HPLC kolon je potřeba respektovat rozmezí pH, ve kterém je stacionární fáze stabilní. Tento typ kolony (založené na silikagelu) má rozmezí pH od 3 do 8 (oproti polymerním ZIC®-pHILIC kolonám, na kterých lze měřit až při pH 2 – 10). Při pH mimo toto rozmezí hrozí nenávratné zničení kolony. Tento typ kolony by se neměl promývat silně zásaditými roztoky nebo NaOH. S kolonou je možné pracovat až do teploty 70^{o}C[28].

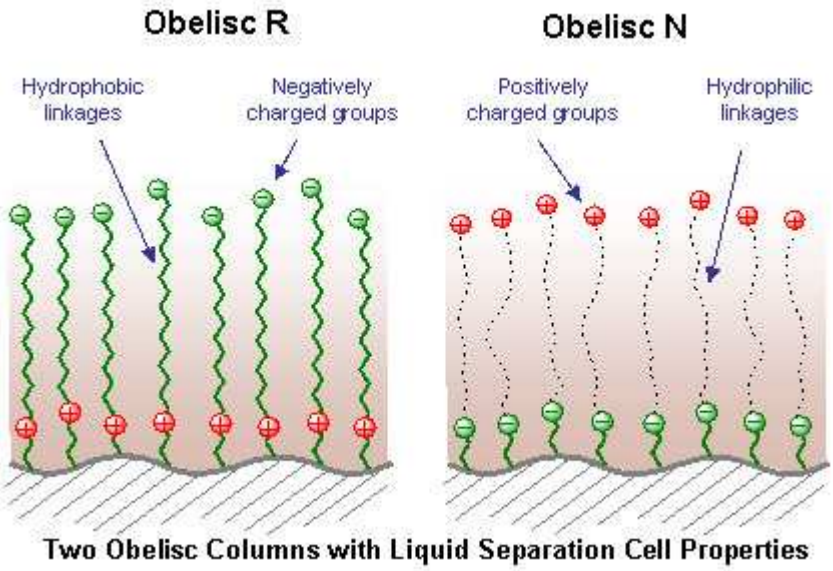
Kolony ZIC®-HILIC se dodávají plněné 3µm nebo 5µm částicemi a v různých formátech, od klasických analytických a kapilárních kolon až po rozměry pro preparativní chromatografii[26].

Mohou být použity ke změně selektivity nebo ke zlepšení rozlišení píků polárních a hydrofilních sloučenin (sacharidy, metabolity, kyseliny a zásady, organické a anorganické ionty, kovové komplexy, aminokyseliny, peptidy a proteiny)[28].

Další typ stacionární fáze je založen **na bázi kapalných cel (LiSC)**, jež jsou komerčně vyráběné pod názvem Obelisc. Tato kolona byla taktéž použita při hledání vhodných chromatografických podmínek.

OBELISC N kolona

Kolony Obelisc mají uplatnění jak v hydrofilní kapalinové chromatografii tak i v kapalinové chromatografii na systému obrácených fází. Kolona Obelisc N, která byla použita v této diplomové práci je určena pro hydrofilní chromatografii, kolona Obelisc R pro hydrofobní (viz Obr. 5).



Obr. 5: Dva typy povrchu Obelisc kolon (Obelisc R pro chromatografii na reverzních fázích, Oblelisc N pro hydrofilní chromatografii).

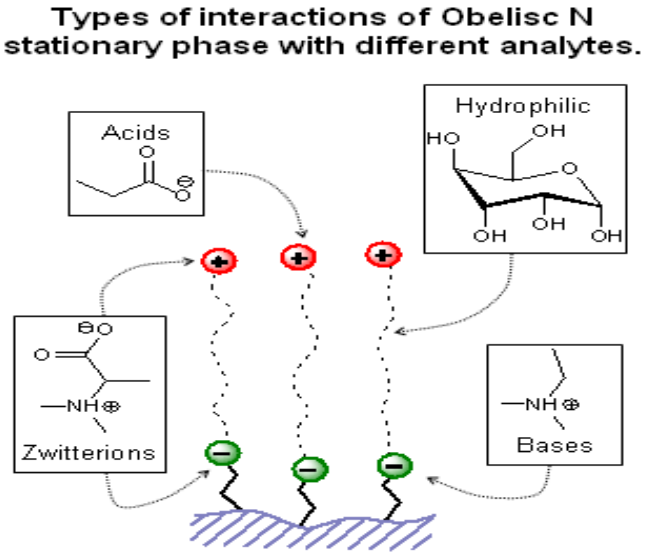
Obě kolony jsou založené na bázi Liquid Separation Cell (LiSC) technologie a nabízejí nové přístupy k separaci malých molekul[29].

Separační technologie této kolony spočívá v nové chemické modifikaci pórů silikagelu, kdy se vytváří kapalné separační cely, které mají vlastní náboj, iontovou sílu a hydrofobní vlastnosti. Tyto cely jsou s mobilní fází ve stálé rovnováze. Prostředí uvnitř cel se velmi liší od prostředí mobilní fáze (vnější prostředí). Mezi tři hlavní charakteristiky cel, kterými se liší od tradičních separačních materiálů, patří:

- významně větší iontová síla v cele oproti té v mobilní fázi, jenž umožňuje rychlý a hromadný přechod nabitých analytů dovnitř a ven z cely, i přes nízkou koncentraci pufru v mobilní fázi;
- stacionární fáze zabírá celý prostor separační cely, což poskytuje fázi vysokou kapacitu;
- kladné a záporné náboje ligandu cely oddělené dlouhým organickým spojovacím řetězcem umožňují kladným i záporným nábojům účastnit se současně na elektrostatické interakci[30].

  Při separaci dochází k interakci dlouhého spojovacího řetězce stacionární fáze s mobilní fází[31].

Kolona Obelisc N má vlastnosti normální fáze. Má aniony blíže k povrchu, oddělené od katonických skupin hydrofilním spojovacím řetězcem. Má velmi polární vlastnosti a funguje dobře pro polární a nabité analyty. V módu iontové výměny reagují nabité analyty s opačně nabitými skupinami stacionární fáze. Obelisc N má jak kladně tak záporně nabité skupiny k interakcím s kladně nebo záporně nabitými analyty[30] (viz Obr. 6).



Obr. 6: Typy interakcí stacionární fáze kolony Obelisc N s různými analyty.

Koncentrace pufru, pH pufru a koncentrace organické složky jsou parametry mobilní fáze, které umožňují úpravu vlastností kolony pro separace komplexních směsí[29].

Typické mobilní fáze používané s Obelisc kolonami jsou založeny na acetonitrilu, vodě a s mass spec kompatibilními pufry – mravenčan amonný a octan amonný[31].

Kolony Obelisc jsou dostupné v různých formátech a dodávají se plněné 2,5 µm nebo 10 µm částicemi.

Použitím těchto kolon k chromatografické separaci získáme velmi odlišné výsledky od všech ostatních chromatografických kolon. Náboj a konformace řetězce jsou vlastnosti, které působí dramatické změny v separační selektivitě[30].

2.2.4 Využití HILIC

Hlavní a vesměs jediné využití hydrofilní interakční kapalinové chromatografie spočívá v možnosti analýzy a separace velmi polárních a hydrofilních látek a jejich směsí. Tedy takových sloučenin, pro jejichž analýzu není dostačující kapalinová chromatografie na normální nebo reverzní fázi.

HILIC se velmi často využívá pro separace malých molekul. Bylo provedeno opravdu mnoho analýz v této oblasti. Pomocí této metody lze např. stanovovat koncentrace léčiv a různých metabolitů v lidských tekutinách (převážně krev, sérum, moč).

Na základě publikací, které se věnují využití HILIC, lze předpokládat, že přednostně bude metoda uplatňována pro separace aminokyselin[32] a peptidů[33]. Pro tyto účely byly již nalezeny vhodné podmínky v různých systémech izokratické a gradientové eluce. Své uplatnění nalézá HILIC i v separaci oligonukleotidů, složek nukleových kyselin a cukrů (oligo- a polysacharidů)[17].

Mezi další klasické příklady separace technikou HILIC patří separace polárních organických kyselin a zásad[8].

2.3 Stanovované látky

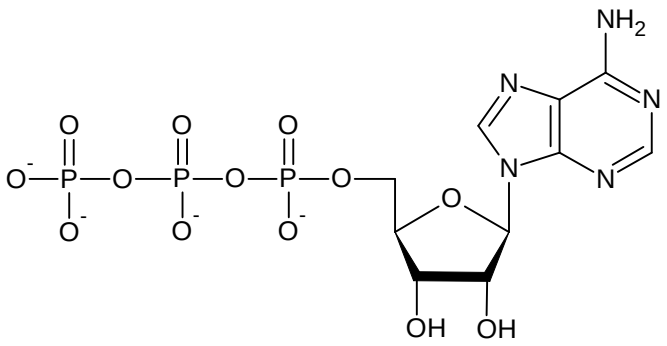
Tato diplomová práce je zaměřená na studium možnosti současné analýzy následujících analytů: adenosin-5´-trifosfát (ATP), adenosin-5´-difosfát (ADP), adenosinmonofosfát (AMP), cyklický adenosin-3´,5´-monofosfát (cAMP), kreatin (C), fosfokreatin (PC).

Všechny zmíněné polární látky jsou velmi významné, ať už z hlediska jejich funkce v organismu nebo jejich dalšího možného využití.

Z těchto látek jsou pro živočišný i rostlinný organismus nejdůležitější tzv. adeninribonukleotidy. Jedná se o souhrnné označení ATP, ADP, AMP a cAMP. Význam adenosinfosfátů pro energetické poměry je zásadní. Energetický stav buňky se vyjadřuje tzv. energetickým nábojem, který lze vypočítat z aktuálních intracelulárních koncentrací ATP, ADP a AMP. Adenosinfosfáty slouží také jako významné efektory aktivity regulačních enzymů – ATP je inhibitorem katabolických drah (zejména citrátového cyklu a glykolýzy), ADP a AMP bývají naopak aktivátory těchto drah[34].

2.3.1 Adenosin-5´-trifosfát = ATP

Jedná se o nukleotid, který je složen z molekuly adenosinu (souhrnný název pro adenin a ribózu) a tří fosfátů (zbytek od kyseliny fosforečné) – viz Obr. 7. Tyto fosfáty jsou „klíče“ k aktivitě ATP[35].



Obr. 7: Chemický vzorec ATP.

Význam ATP:

ATP má význam převážně energetický. Je to nejdůležitější makroergická sloučenina v živých soustavách. Jedná se o hlavní přenašeč chemické energie ve všech typech organismů. Energii, která je uložena do struktury ATP (je zabudována do makroergní vazby mezi druhým a třetím fosfátem[6]) organismus využívá pro procesy, které vyžadují energii[36].

ATP vzniká v mitochondriích při procesu buněčného dýchání a fotosyntézy. Je schopné vratně uschovat až 50 kJ energie. V místě potřeby je molekula ATP rozložena na adenosindifosfát a samostatný fosfát (toto štěpení je zprostředkováno nejčastěji kinázami ze skupiny transferáz[34]) a energie uložená ve vazbě mezi nimi se uvolní. ATP se oxidací svých vazeb mění na ADP (adenosindifosfát) + P nebo úplnou oxidací ATP na AMP (adenosinmonofosfát) + P + P[6].

Energie se z ATP uvolňuje reakcemi katalyzovanými především:

- ligázami, které štěpí ATP na ADP nebo AMP a uvolněná energie se vloží do nově vznikajících kovalentních vazeb;
- hydrolázami (ATPázy), kdy se energie využívá především pro pohyb nebo aktivní transport;

- transferázami, které z molekuly ATP přenášejí některou část na druhý substrát, přenášenou částí může být zbytek kyseliny fosforečné nebo difosforečné, ADP, AMP nebo dokonce jen adenosin[34].

Energetické substráty, ATP obzvlášť, jsou nezbytné k tomu, aby udržovali buněčnou strukturu a buněčné funkce jako je aktivní transport, syntéza proteinů, jejich fosforylace a zpracování, synaptický přenos a také intracelulární homeostázu iontů[37,38,39].

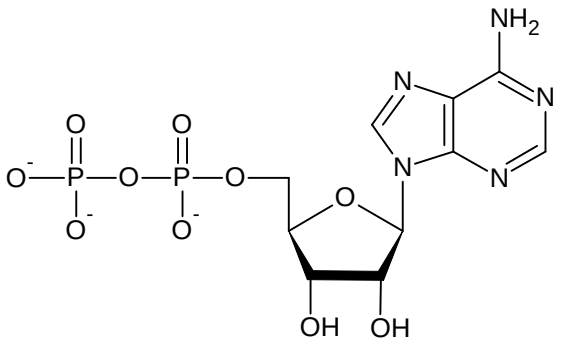
Kromě své intracelulární role energetického přenašeče, má ATP i funkci extracelulární. Konkrétně je zapojeno do procesů neurotransmise, mechanosenzorické transdukce, vylučovací a vazodilatační funkce a dlouhodobé signalizující funkce ve vývoji a regeneraci buněk[40,41].

ATP se také uvolňuje při rozpadu buněk (např. při orgánovém poškození) a může tak zprostředkovat řadu odpovědí, včetně uvolnění cytokinů, tumor nekrotizujícího faktoru α a interleukinu-1β z monocytů a makrofágů, také usnadňuje adhezi leukocytů k endoteliu[42,43]. In vitro bylo prokázáno, že po vystavení ATP dochází k potlačení proliferace (bujení) mnoha linií nádorových buněk[44,45,46].

Farmakologické použití ATP vychází ze zpráv o jeho přínosu v bolesti, cévních onemocněních a rakovině[42].

2.3.2 Adenosin-5´-difosfát = ADP

Jedná se o nukleotid, který je složen z molekuly adenosinu a dvou fosfátů – viz Obr. 8.



Obr. 8: Chemický vzorec ADP.

Význam:

Vzhledem k tomu, že obsahuje jednu markroergickou vazbu, může při metabolických reakcích uvolňovat energii (pak se mění na AMP). Nebo ji může naopak získávat ve formě další makroergické vazby s dalším fosfátem (pak se mění na ATP). Na tvorbě ATP se podílí ATP syntáza, jeho defosforylací pomocí enzymů ATPáz vzniká opět ADP.

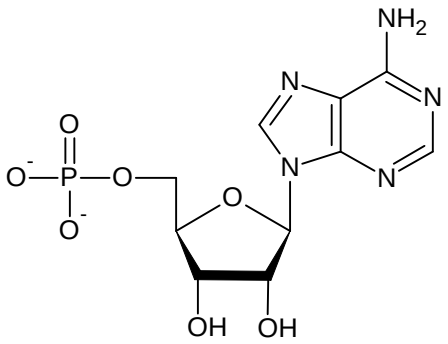
ADP se na ATP mění například při fotosyntéze (pomocí sluneční energie) nebo při buněčné respiraci (pomocí energie získané rozkladem glukózy)[6].

Za zmínku stojí i to, že se ADP podílí na tvorbě destičkového trombu v první fázi procesu zástavy krvácení. ADP je přímo uložený v trombocytech a při krvácení výrazně stimuluje shlukování těchto trombocytů[47].

Tento poznatek je využit i ve farmaceutickém odvětví. Existují léčivé přípravky, které ovlivňují míru podílu ADP na srážení krve. Např. klopidogrel prostřednictvím blokády vazby ADP na jeho destičkový receptor zabraňuje aktivaci a agregaci trombocytů. Klopidogrel je indikován u dospělých k prevenci aterotrombotických příhod[48,49].

2.3.3 Adenosinmonofosfát = AMP

Přesněji adenosin-5´-fosfát, též kyselina adenylová. Jedná se o nukleotid, který je složen z molekuly adenosinu a jednoho fosfátu – viz Obr. 9.



Obr. 9: Chemický vzorec AMP.

Význam:

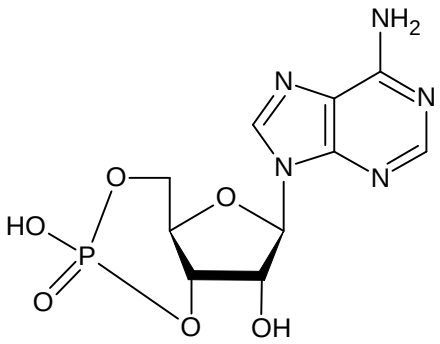
Vzniká pomocí enzymu adenylátkinázy, který udržuje v buňce energetickou rovnováhu. Dále vzniká hydrolýzou nukleotidů s vyšším počtem fosfátových skupin, ale např. i při rozkladu RNA v buňce na jednotlivé nukleotidy (je jedním ze stavebních nukleotidů RNA)[6].

Má podobně jako mnohé ostatní nukleotidy, centrální postavení v energetickém metabolismu[6]. Jeho koncentrace v buňkách roste při energetickém vyčerpání, proto je aktivátorem katabolických procesů, které doplňují hladinu ATP[34].

Zajímavostí je, že se zřejmě podílí i na vnímání chuti. Jeho přítomnost v potravě způsobuje, že chutná sladce, ačkoliv samotné AMP je kyselé. Tato skutečnost by mohla hrát roli ve vývoji potravin, které chutnají sladce, ale nezpůsobují obezitu[6,50,51].

2.3.4 Cyklický adenosin-3´,5´-monofosfát = cAMP

Jedná se o derivát adenosintrifosfátu (ATP) a z něj také vzniká působením membránového enzymu adenylátcyklázy[34] – viz Obr. 10.



Obr. 10: Chemický vzorec cAMP.

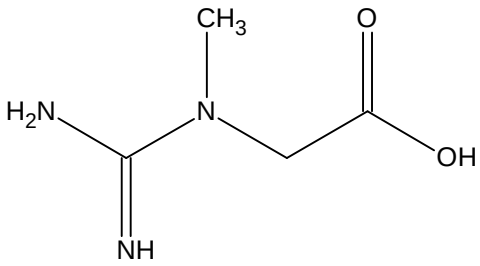
Význam:

V buňkách zastává funkci tzv. druhého posla v řadě signálních drah. Působí tak jako aktivátor proteinkináz, které následně fosforylují další enzymy, a tím je aktivují nebo deaktivují.

Je rozkládán specifickými fosfodiesterázami, čímž dochází k hydrolýze fosfodiesterové vazby v molekule cAMP a rozkladu na adenosin-5´-fosfát. Fosfodiesterázy se tak podílí na regulaci hladiny druhých poslů v cytoplazmě[6].

2.3.5 Kreatin

Jedná se o dusíkatou organickou kyselinu – viz Obr. 11. Nejvíce je obsažena ve svalové tkáni – proto se kreatinu říká svalový enzym.



Obr. 11: Chemický vzorec kreatinu.

Zdrojem kreatinu je maso, rostliny jej neobsahují.

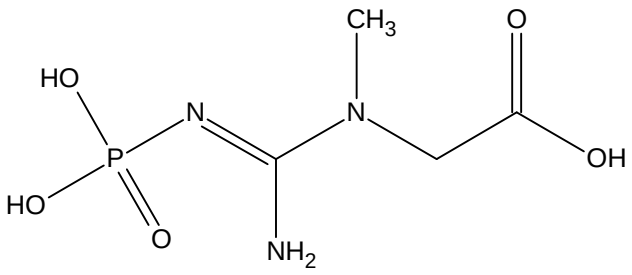
Význam:

Hlavní úlohou kreatinu je zásobování svalových a nervových buněk energií. Dnes je hojně užíván k terapeutickým účelům – jako kreatin monohydrát se používá při škále různých nervosvalových poruch za účelem urychlení rehabilitace. Dále je zkoumáno použití kreatinu pro léčebné účely (svalové, neurologické a kombinované choroby, arthritis, infarktové stavy).

Využití kreatinu najdeme též v oblasti potravinářské a to jako kultivátor vinného kvašení. Nejvíce je však dnes kreatin používán ve sportovním odvětví a to díky svému účinku na zvýšení svalové síly a objemu svalů (natahuje do svalů vodu)[6].

2.3.6 Fosfokreatin = kreatinfosfát

Fosfokreatin je sloučenina molekuly kreatinu a jedné molekuly fosfátu, jedná se o energeticky velmi bohatou formu kreatinu – viz Obr. 12. Fosfát je připojen snadno štěpitelnou vazbou.



Obr. 12: Chemický vzorec fosfokreatinu.

Význam:

Poskytuje rychle mobilizovatelnou rezervu vysokoenergetických fosfátů v kosterním svalstvu a mozku. Právě v těchto tkáních, které mají vysokou a kolísavou spotřebu energie, hraje zvlášť důležitou roli[6]. Slouží pro rychlou regeneraci ADP na ATP, svoji fosfátovou skupinu předává ATP a tím ho rychle převádí zpět do použitelné podoby. V případě potřeby je energie uvolněna z ATP odštěpením jedné fosfátové skupiny, ta je pak doplňována z fosfokreatinu, čímž vzniká kreatin. Kreatin je dále v mitochondriích opět obohacen novou fosfátovou skupinou. Tvorba nového fosfokreatinu v mitochondriích je závislá na dostatku kyslíku.

Reverzibilní fosforylace kreatinu je katalyzována několika kreatinkinázami. Přítomnost kreatinkinázy (CK-MB, MB znamená sval/mozek) v krevní plazmě je známkou poškození tkáně a používá se při diagnostice infarktu myokardu[52].

Fosfokreatin má také farmaceutický význam. Existuje léčivý přípravek s účinnou látkou fosfokreatin (Neoton). Přípravek je indikován k léčbě ischemických stavů myokardu a mozku, jako je ischemická choroba srdeční, cévní mozková příhoda, prevence ischemických operačních komplikací (resuscitace, traumata hlavy, polytraumata), k ochraně srdečního svalu při kardiochirurgických výkonech, kdy se přidává do kardioplegických roztoků a k léčebné rehabilitaci při snížené aktivitě příčně pruhovaného svalstva[53].

2.4 Přehled vybraných analytických metod pro stanovení adeninribo-nukleotidů, kreatinu a fosfokreatinu

Vzhledem k velkému významu především ATP, ADP a AMP, bylo publikováno již mnoho studií, ve kterých byly zkoumány možnosti separace těchto polárních látek pomocí různých separačních metod (chromatografických a elektroforetických) a také metody kvantitativního stanovení těchto látek.

Pro stanovení adeninových nukleotidů byly použity různé metody, včetně následujících:

- enzymová analýza = enzyme assay[54],
- bioluminiscence – stanovení ATP v bakteriích,
- ^{31}P nukleární magnetická rezonance,
- vysoce účinná kapalinová elektroforéza,
- plynová chromatografie,
- HPLC s reverzním uspořádáním fází s mechanismem iontové výměny[55,56,57,58,59,60],
- HPLC s gradientovou elucí [61,62,63],
- metody založené na výměně iontů[42],
- a mnoho dalších.

Jednou z publikovaných metod je souběžné stanovení ATP a jeho metabolitů v lidské krvi pomocí HPLC s reverzním uspořádáním s využitím UV detekce při 254 nm. Jednoduchá metoda HPLC byla optimalizována a použita pro studium metabolismu ATP v organismu. Stanovení probíhalo v režimu gradientové eluce za použití chemicky vázané stacionární fáze C18 a dvou mobilních fází (A a B). Mobilní fáze A byla tvořena 50 mM fosfátovým pufrem (pH 6,0) a mobilní fázi B tvořil 100% methanol. V průběhu analýzy se tyto fáze mísily dle gradientu: 0-2 min (100 % A), 2-10 min (postupná změna složení až na 87,5% A : 12,5% B), 10-12 min (87,5% A : 12,5% B), 12-17 min (postupná změna složení až na 100% A). Pro ekvilibraci kolony bylo zapotřebí dalších 2 minut. Tato metoda poskytla dobré chromatografické výsledky a tvar píku pro všech 8 složek a to během 19 minut[41].

Mezi další metody stanovení adeninribonukleotidů patří iontově výměnná HPLC, která byla použita pro kvantifikaci energetických markerů při mozkové ischémii. Stanovení adeninových nukleotidů v mozkové tkáni má velký význam pro zjištění změn v průběhu ischémie a následné reperfúze. Analýza probíhala za použití reverzní stacionární fáze C18 a mobilní fáze, která byla složena ze 100 mM KH_2PO_4, 1 mM hydroxidu tetrabutylamonného a 2,5% acetonitrilu. Pomocí KOH bylo pH mobilní fáze upraveno na 7. Detekce byla provedena při vlnové délce 254 nm. Celková doba analýzy trvala 30minut[37].

Dále lze zmínit hydrofilní interakční kapalinovou chromatografii, která byla použita i v této diplomové práci. Analýza byla provedena v režimu jednostupňového gradientu a trvala 26 min. V jejím průběhu byl zkoumán vliv složení mobilní fáze na retenci analytů a efektivnost celé analýzy. Mobilní fáze byla tvořena směsí acetonitrilu a 10 mM fosfátu sodného, jež se vzájemně mísily v různých poměrech. Bylo zpozorováno, že se zvyšováním podílu acetonitrilu v mobilní fázi dochází ke zvýšení retence analytů a účinnosti analýzy. Blíže viz hydrofilní interakční chromatografie nukleotidů a jejich meziproduktů na TiO_2 [16].

Oproti adeninovým nukleotidům bylo pro stanovení kreatinu a fosfokreatinu publikováno méně analytických metod. Jednou z nich je např. stanovení karnosinu, anserinu, baleninu, kreatinu a kreatininu pomocí hydrofilní interakční chromatografie nebo iontově výměnné chromatografie, HPLC na reverzní fázi. Kreatin je nejčastěji stanovován Folinovou metodou, založené na Jaffého reakci, která je základem některých oficiálních metod [64,65].

Pro možné porovnání jsou dále uvedeny metody, ve kterých byly až na cAMP stanovovány příp. separovány všechny látky jenž byly předmětem této diplomové práce. Nicméně veškerá stanovení byla provedena v reverzním uspořádání HPLC a tak dosud nebyla publikována žádná práce zabývající se současným stanovením ATP, ADP, AMP, cAMP, C, PC v HILIC módu, popř. normálním uspořádání HPLC.

Iontově výměnná kapalinová chromatografie na obrácených fázích byla popsána pro separaci kreatinu, fosfokreatinu a adenosinových metabolitů v plasmě a srdeční tkáni. Analýza byla prováděna za použití stacionární fáze C18 a dvousložkové mobilní fáze v režimu gradientové eluce. Počáteční mobilní fáze (A) se skládala z 0,1 M bezvodého hydrogenfosforečnanu draselného a 0,01 M fosforečnanu tetrabutylamonného ve vodě. Mobilní fáze B obsahovala stejné komponenty, ale rozpuštěné ve 40% methanolu. Gradientová eluce byla započata se 100% A jako mobilní fáze a v průběhu analýzy se měnil poměr fáze A : B až na 50 : 50, poté opět stoupalo zastoupení mobilní fáze A až ke 100%. Celková doba analýzy nepřesáhla 15min. Detekce byla prováděna při vlnových délkách 214 a 254 nm[66].

Mezi další práce, které pojednávaly o podobné problematice, patří stanovení kreatinu, fosfokreatinu, purinových bází a nukleotidů (ATP, ADP, AMP, GTP, GDP) ve srdeční tkáni pomocí iontově výměnné kapalinové chromatografie na reverzních fázích. Při analýze byla jako v předchozí metodě, použita gradientová eluce dvousložkovou mobilní fází. Pufr A byl tvořen 35 mM KH_2PO_4, 6 mM hydrogensulfátem tetrabutylamonným (pH 6.0), 125 mM EDTA. Pufr B byl tvořen směsí pufru A a acetonitrilu v poměru 50 : 50. Jako stacionární fáze byla použita kolona s navázanými C18. Gradientová eluce byla započata 10 minutovou izokratickou elucí při složení 98% A : 2% B a končila na 45% A : 55% B po dalších 10min. Celková doba analýzy trvala necelých 22minut[67].

Dále bylo provedeno současné stanovení kreatinových sloučenin a adeninových nukleotidů v myokardu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzních fázích. Jako stacionární fáze byla opět použita kolona s C18, režim gradientové eluce a UV detekce při 210nm. Mobilní fáze A se skládala z 0,2 M KH_2PO_4 o pH 5; mobilní fáze B byla směsí vody/acetonitrilu a methanolu (50/25/25). Před nástřikem byla kolona ekvilibrována 1% B. V první minutě začal gradient stoupat z 1% B až na 35% B ve 4. minutě. V čase 4,2 se gradient vrátil ke složení 1% B. Kolona pak byla ekvilibrována ještě na 3,8 minut. Celková doba analýzy tak trvala 8minut[68].

Posledním příkladem podobného stanovení je vývoj HPLC metody s iontově párovým mechanismem pro stanovení složek metabolismu ve srdeční tkáni (adeninové nukleotidy a sloučeniny kreatinu). Byla vyvinuta izokratická HPLC metoda pro kvantifikaci kreatinu, fosfokreatinu, AMP, ADP, ATP a hypoxanthinu. Chromatografické podmínky byly: reverzní fáze C18, mobilní fáze složená z 215 mM KH_2PO_4, 2,3 mM hydrogensulfátu tetrabutylamonného, 4% acetonitrilu a 0,4% 1 M KOH[69].

3 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout vhodné chromatografické podmínky pro současnou separaci ATP, ADP, AMP, cAMP, kreatinu a fosfokreatinu za využití HILIC stanovení.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

Adenosintrifosfát, Sigma-Aldrich, Německo,
Adenosindifosfát, Sigma-Aldrich, Německo,
Adenosinmonofosfát, Sigma-Aldrich, Německo,
Cyklický adenosinmonofosfát, Sigma-Aldrich, Německo,
Kreatin, Sigma-Aldrich, Německo,
Fosfokreatin, Sigma-Aldrich, Německo.

Methanol, Merck, Německo,
Acetonitril, Merck, Německo,
Octan amonný, Lachema, Česká republika,
Kyselina mravenčí, Sigma-Aldrich, Německo,
Amoniak, Sigma-Aldrich, Německo,
Mravenčan amonný, Sigma-Aldrich, Německo,
voda čištěná reverzní osmózou.

4.2 Přístrojové vybavení

4.2.1 Chromatografický systém

Měření byla prováděna na HPLC sestavě LC 20A Prominence, která se skládá z degasseru, dvou pump (A, B), automatického dávkovače vzorků, termostatovaného prostoru pro kolonu, detektoru (UV/VIS popř. DAD) a komunikačního modulu, Schimadzu, Německo.

Celý systém byl řízen softwarem LC Solution Software, verze 1.21 SP1, Schimadzu, Německo.

Použité chromatografické kolony:

Obelisc N 150 x 3,2 mm; 5 μm; 100 Å – Sielc, Německo,

ZIC®-HILIC 150 x 2,1 mm; 3,5 μm; 200 Å – Merck (Sequant), Německo.

4.2.2 Ostatní použité přístroje

Analytické váhy, Helago, Česká republika,

Acidimetr, Eutech, Singapur,

Filtrační zařízení s filtrem o velikosti 0,45 μm,

Mikropipety,

Ultrazvuková lázeň.

4.3 Vývoj chromatografických podmínek

Jako stacionární fáze byly použity 2 typy chromatografických kolon (kolona Obelisc N, kolona ZIC®-HILIC).

V průběhu prováděných měřeních bylo zapotřebí dodržet požadavky na vlastnosti (především pH) a složení mobilní fáze dané výrobci jednotlivých kolon. Tím byla limitována možnost použití mobilní fáze, a to doporučeným rozmezím pH hodnot pro kolonu ZIC®-HILIC od 3 do 8, pro kolonu Obelisc N pH v rozmezí 2 – 4,5. Dále bylo nutné dodržet doporučovaný podíl acetonitrilu v mobilní fázi – minimálně by měl tvořit 60%, maximálně 97%, z důvodu nutnosti zachování nejméně 3% obsahu vodné složky, pro HILIC analýzy.

4.3.1 Optimalizace složení mobilní fáze

Při vývoji vhodných chromatografických podmínek byla používána izokratická a následně i gradientová eluce s mobilní fází složenou ze dvou částí – z acetonitrilu a pufru. Vedle čistého acetonitrilu byl v jednom z měřeních acetonitril zčásti nahrazen methanolem, avšak toto se neukázalo být výhodné a z toho důvodu se v dalších měřeních opět používal acetonitril. Část organické složky mobilní fáze v podobě acetonitrilu byla později upravena přídavkem vodného pufru. Jako vodná složka mobilní fáze byl zprvu používán octan amonný, později byla provedena i eluce s mravenčanem amonným.

Další obměny vodné složky mobilní fáze, pufru, spočívaly ve změně pH. Analýzy byly prováděny při následujících hodnotách pH: 3,5; 4,1; 6,0; 6,1; 6,2; 6,35; 6,4; 6,45; 6,5; 6,57; 6,8; 7,0. Dále byl zkoumán vliv síly pufru na separaci analytů za použití pufrů o síle 2, 5, 10, 20 a 100 mM.

Při stanovení daných analytů byly jednotlivé složky mobilní fáze míseny při izokratické eluci v těchto poměrech (acetonitril : vodný pufr) – 60 : 40, 70 : 30, 75 : 25, 78 : 22, 80 : 20, 82 : 18. Během gradientové eluce byly použity následující gradienty:

- Gradient 1:
  80% ACN (0.01 min) → 60% ACN (15.00 min) → 80% ACN (15.01 min) – do 25.00 min.

- Gradient 2:
  80% ACN (0.01min) → 60% ACN (16.00 min) → 80% ACN (16.01 min) – do 25.00 min.

- Gradient 3:
  80% ACN (0.01min) → 60% ACN (14.00 min) → 80% ACN (14.01 min) – do 25.00 min.

- Gradient 4:
  80% ACN (0.01min) → 65% ACN (14.00 min) → 80% ACN (14.01 min) – do 25.00 min.

- Gradient 5:
  80% ACN (0.01min) → 55% ACN (15.00 min) → 80% ACN (15.01 min) – do 25.00 min.

- Gradient 6:
  80% ACN (0.01min) → 60% ACN (15.00 min) → 60% ACN (20.00 min) → 80% ACN (20.01 min) – do 25.00 min.

- Gradient 7:
  85% ACN (0.01min) → 70% ACN (15.00 min) → 85% ACN (15.01 min) – do 25.00 min.

- Gradient 8:
  90% ACN (0.01min) → 70% ACN (15.00 min) → 70% ACN (20.00 min) → 90% ACN (20.01 min) – do 40.00 min.

- Gradient 9:
  85% ACN (0.01min) → 70% ACN (15.00 min) → 70% ACN (20.00 min) → 85% ACN (20.01 min) – do 40.00 min.

- Gradient 10:
  80% ACN (0.01 min) → 70% ACN (15.00 min) → 70% ACN (20.00 min) → 80% ACN (20.01 min) – do 40.00 min

4.3.2 Výběr vhodné vlnové délky pro UV detekci

Výběr vlnových délek probíhal s ohledem na absorpční maxima jednotlivých analytů. Díky rozdílu v absorpčních maximech byly pro detekci analytů použity vždy dvě vlnové délky. A to 220 nm pro detekci kreatinu a fosfokreatinu a 254 nm pro detekci ATP, ADP, AMP, cAMP.

4.3.3 Další chromatografické podmínky

Kolony byly termostatovány na teplotu 25^{o}C. Teplota v autosampleru byla nastavena na hodnotu 15^{o}C, aby se zabránilo možnému rozkladu vzorku před analýzou. Průtok mobilní fáze byl při vlastní analýze nastaven na 0,3 ml/min. Na kolonu byl pomocí autosampleru nastřikován vzorek o objemu 1 µl.

4.3.4 Příprava mobilní fáze

Při analýzách byly používány mobilní fáze složené vždy z acetonitrilu, zastoupeného ve větším poměru a dále z vodného pufru. Byly použity 2 typy pufru (octan a mravenčan amonný).

Octanový pufr byl připraven rozpuštěním příslušné navážky octanu amonného (dle požadované síly pufru) v čištěné vodě. Takto získaný zásobní roztok byl dále v případě potřeby upraven na požadované pH. Následně byl roztok zfiltrován přes filtr

o rozměrech 0,45 μm. Mravenčanový pufr byl připraven obdobným způsobem rozpuštěním příslušné navážky mravenčanu amonného v čištěné vodě.

Druhá složka mobilní fáze byla tvořena acetonitrilem, nebo smísením acetonitrilu s methanolem v poměru 80 : 20. Také byl použit acetonitril s vodným pufrem připravený rozpuštěním odpovídající navážky mravenčanu amonného v čištěné vodě a doplněním tohoto roztoku příslušným množstvím acetonitrilu. I zde bylo nutné vodný pufr před použitím zfiltrovat.

4.3.5 Příprava roztoků standardů

Nejprve byla odpovídající navážka standardu (2 – 2,5 mg látky) rozpuštěna v 1 ml čištěné vody. K zajištění úplného rozpuštění pevné látky byla použita ultrazvuková lázeň. Z takto připravených roztoků bylo odebráno 250 μl a zbytek roztoku byl zmrazen a uchováván k dalšímu použití. 250 μl roztoku standardu bylo napipetováno do vialky a poté bylo přidáno takové množství acetonitrilu nebo směsi acetonitril/voda aby byl výsledný objem 1 ml v vzorek byl rozpuštěn v 50 – 75% acetonitrilu.

Přídavek acetonitrilu k roztoku vzorku vycházel z poznatku, že by vzorky měly být připraveny zhruba ve stejném procentuelním zastoupení ACN jako je v mobilní fázi.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Vývoj chromatografických podmínek pro analýzu ATP, ADP, AMP, cAMP, C, PC – analýza na koloně Obelisc N

Při vývoji vhodných chromatografických podmínek, které by zaručily optimální separaci ATP, ADP, AMP, cAMP, C, PC byly použity 2 typy kolon. První z nich byla kolona Obelisc N. Vzhledem k tomu, že maximální doporučené pH mobilní fáze při práci s touto kolonou je 4,5 byla prvotní analýza prováděna za pH mobilní fáze 4,1. Mobilní fáze se skládala z octanového pufru a acetonitrilu v poměru 50 : 50. Stejně tak vzorky jednotlivých standardů byly rozpuštěny v prostředí 50% acetonitrilu.
Byla provedena měření při 2 sílách pufru – 10 a 20 mM, a také při změně organického podílu v mobilní fázi na 60%.

Na této koloně se bohužel za daných podmínek nepodařilo separovat všechny analyty a tak byla pro další analýzy použita nová kolona – ZIC®-HILIC, která je rovněž vhodná pro separace polárních látek. Výhodou této kolony je možnost použití širšího rozmezí pH hodnot mobilní fáze. Oproti předchozí koloně, na této proběhlo mnohem více měření, při kterých byly zpozorovány jisté zákonitosti posunu retenčních časů standardů a změny tvaru jejich píků v závislosti na změně pH, síly pufru a procentuelním zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi.

5.2 Vývoj chromatografických podmínek pro analýzu ATP, ADP, AMP, cAMP, C, PC – analýza na koloně ZIC®-HILIC

5.2.1 Závislost retenčních časů a tvarů píků stanovovaných látek na zvyšování procentuelního zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi

Při analýzách za různého procentuelního zastoupení organické složky v eluentu bylo zjištěno, že se zvyšováním organického podílu (v našem případě acetonitrilu) dochází ke zvýšení retence analyzovaných látek a tím ke zvýšení jejich retenčních časů a celkovému prodloužení doby analýzy.

Výhodou je, že stoupá účinnost separace a zvyšuje se rozdíl retenčních časů vzájemně mezi sebou, což má za následek lepší oddělení separovaných látek v případě nástřiku směsi.

Během měření bylo zjištěno, že při použití 90% a více acetonitrilu v mobilní fázi dochází k výraznému zhoršení tvaru píků a navíc se analýza stává příliš zdlouhavou. Kromě toho je použití vyšších koncentrací acetonitrilu v mobilní fázi limitováno i špatnou rozpustností analytů obsahujících fosfáty.

5.2.2 Závislost retenčních časů a tvarů píků stanovovaných látek na zvyšování pH pufru mobilní fáze

Při hledání vhodného pH pro separaci bylo zjištěno, že nejnižší možné pH pufru je 3,5. Při nižším pH nelze analýzu provádět, protože ATP se při těchto podmínkách nepodařilo detekovat. Při pH vyšším než 3,5 docházelo k celkovému zkrácení doby analýzy, tedy i retenčních časů jednotlivých analyzovaných standardů. U této kolony byla možnost změny pH limitována horní hranicí pH 8.

Bylo zjištěno, že změna pH nemá příliš vliv na tvar píku.

5.2.3 Závislost retenčních časů a tvarů píků stanovovaných látek na změně síly pufru mobilní fáze

Se zvyšující sílou pufru se prodlužuje celkové doba separace stanovovaných látek. Silnější pufr má za následek zvýšení retenčních časů stanovovaných látek, včetně rozestupů mezi retenčními časy jednotlivých analytů, které se tak stávají více oddělené v případě nástřiku směsi. Pouze u kreatinu bylo zpozorováno, že změna síly pufru nemá vliv na zkrácení nebo prodloužení doby jeho eluce a nebo na jeho tvar píku.

Změna síly pufru má oproti změně pH výrazný vliv na tvary píků analyzovaných látek. Při použití slabšího pufru byl tvar píku symetričtější, zvyšováním síly pufru docházelo k rozšiřování (chvostování) píků.

5.3 Konkrétní postup při vývoji chromatografických podmínek v HILIC módu

Zprvu byly analýzy prováděny v režimu izokratické eluce, tedy při jednotném složení mobilní fáze v průběhu celé analýzy. Výběr mobilní fáze probíhal s ohledem na doporučení výrobce chromatografické kolony, ve kterém je uvedeno, že mezi vhodné pufry patří octan nebo mravenčan amonný o síle 5 – 20 mM. Tato síla by měla být dostačující pro většinu aplikací. Výrobce také poukazuje na nutnost alespoň 3% obsahu vody v mobilní fázi k zajištění dostatečné hydratace částí stacionární fáze a tím ke získání reprodukovatelných výsledků.

Jako jedna ze složek mobilní fáze byl zvolen octan amonný, který byl mísen v různém poměru s acetonitrilem. Zpočátku byl připraven tento pufr o síle 5 mM a byl zkoumán vliv procentuelního zastoupení organického rozpouštědla v mobilní fázi na separaci jednotlivých vzorků standardů. Konkrétně byly prováděny analýzy za těchto podmínek:

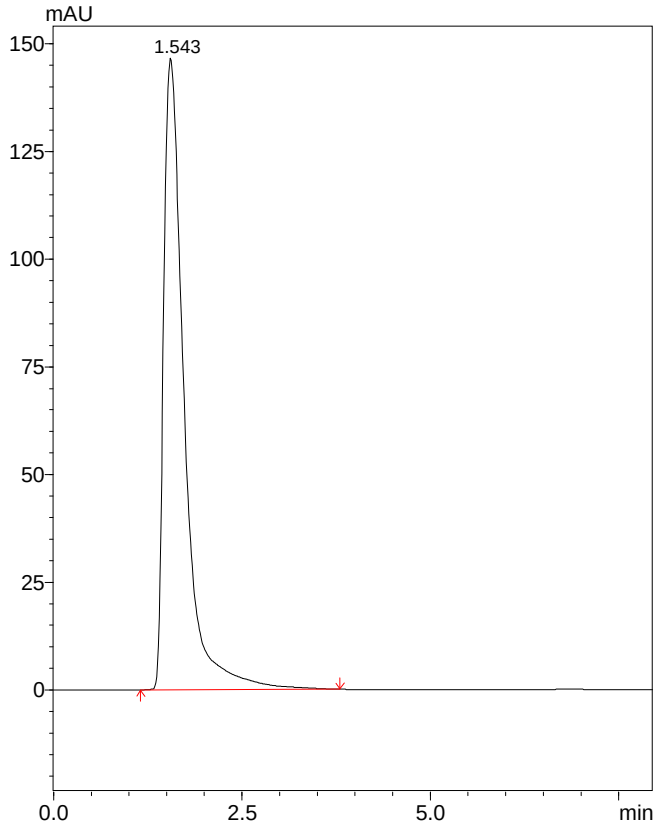
a) 40% 5 mM octanový pufr, pH 4,1, 60% ACN,
b) 30% 5 mM octanový pufr, pH 4,1, 70% ACN.

Z naměřených hodnot retenčních časů (viz Tabulka č. 1) je zřejmé, že v případě analýzy směsi standardů by došlo k jejich vzájemné koeluci a současná analýza by tak nebyla možná. Nicméně získané hodnoty retence jsou důležité vzhledem ke snaze vypozorovat jaký vliv má množství organického rozpouštědla v mobilní fázi na separaci jednotlivých analytů. Jak již bylo uvedeno dříve, projeví se vyšší podíl acetonitrilu v mobilní fázi prodloužením retenčních časů a také dojde k většímu rozdílu mezi retenčními časy stanovovaných látek. Toto je velmi dobře patrné na dvou vybraných chromatografických záznamech AMP při podmínkách a) a b) – viz Obr. 13 a Obr. 14. Také při analýzách ostatních analytů byla tato zákonitost potvrzena, ale pro lepší přehlednost jsou zde uvedeny pouze hodnoty retenčních časů a nikoliv veškeré chromatogramy.

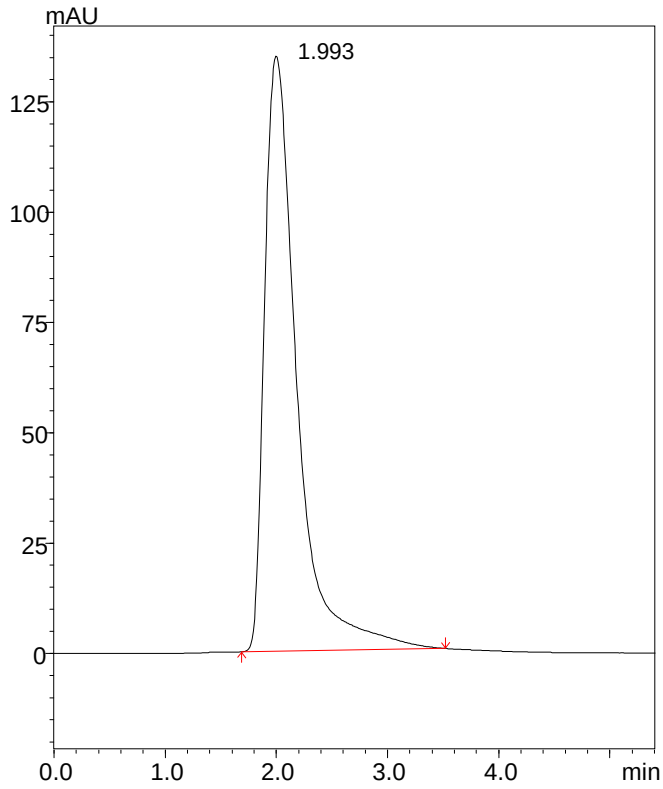
Tabulka č. 1

Analyzovaná látka	R_t při podmínkách a)	R_t při podmínkách b)
AMP	1,5	2,0
ADP	1,7	2,4
ATP	2,0	3,8
C	2,6	4,1
PC	2,1	4,4

Vyšší zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi má ale také vliv na tvar píků. Dochází k postupnému zhoršování tvaru píku při zvyšování podílu acetonitrilu v eluátu.
Při analýzách za výše zmíněných chromatografických podmínek se ale tvar píku příliš neměnil.



Obr. 13: AMP (chromatografické podmínky a) 40% 5 mM octanový pufr, pH 4,1 : 60% ACN).



Obr. 14: AMP (chromatografické podmínky b) 30% 5 mM octanový pufr, pH 4,1 : 70% ACN).

Další obměna chromatografických podmínek spočívala v dalším zvyšování procentuelního zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi, a to následovně:

c) 25% 5 mM octanový pufr, pH 4,1, 75% ACN,
d) 22% 5 mM octanový pufr, pH 4,1, 78% ACN.

Získané chromatografické záznamy jen potvrdily to, co bylo řečeno výše. Opět došlo k prodloužení retenčních časů a celkové doby analýzy.

Dále byla věnována pozornost stanovení vlivu pH pufru na separaci analytů. Jako první byla použita konkrétní hodnota pH právě připraveného pufru, bez jakýchkoli úprav (zde pH 6,0). Pro získání zřetelných rozdílu v retenci bylo snahou velmi výrazně změnit pH. S ohledem na pH rozmezí kolony byla zvolena druhá hodnota pH 3,5. Takto nízké pH bylo dosaženo přidáním kyseliny octové.

Chromatografické podmínky pro demonstraci vlivu pH mobilní fáze:

e) 30% 5 mM octanový pufr, pH 3,5, 70% ACN,
f) 30% 5 mM octanový pufr, pH 6,0, 70% ACN.

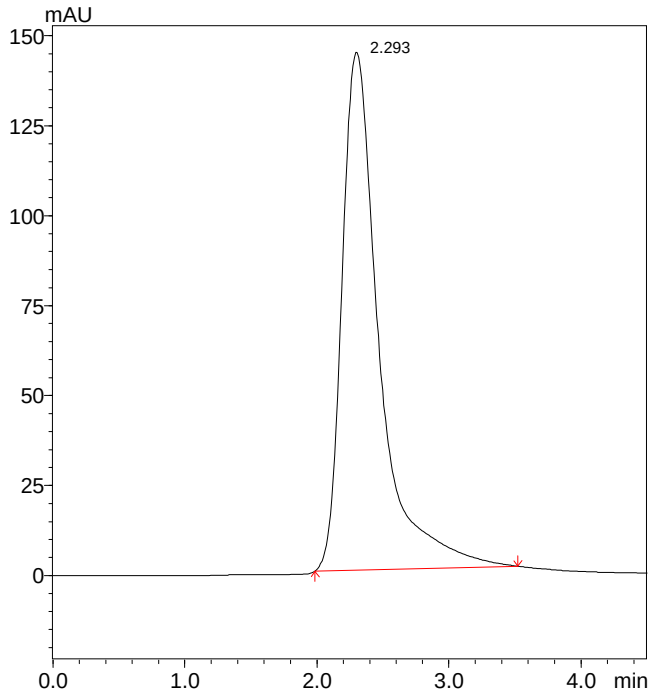
Z naměřených hodnot retenčních časů (viz Tabulka č. 2) vyplývá, že zvýšení pH pufru mobilní fáze má za následek zkrácení analýzy, jednotlivé retenční časy analyzovaných látek jsou menší.

Avšak stále je zde problém případné koeluce při analýze směsi analytů.

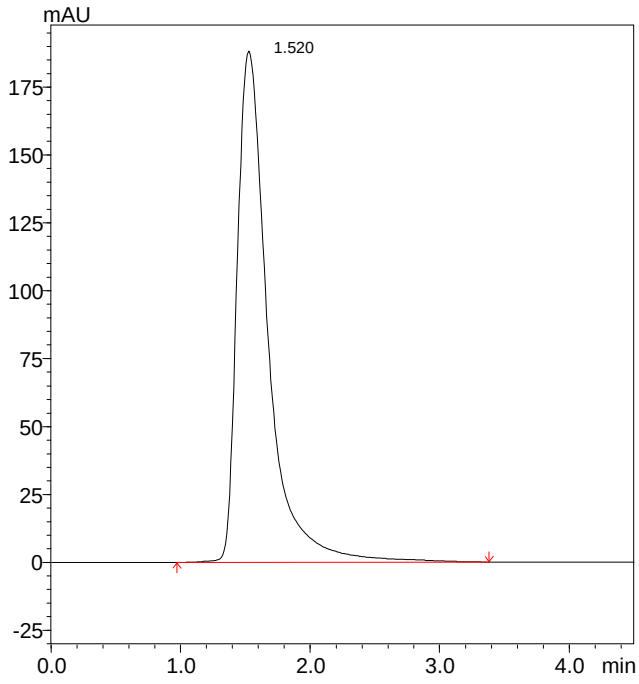
Tabulka č. 2

Analyzovaná látka	R_t při podmínkách e)	R_t při podmínkách f)
AMP	2,3	1,5
ADP	3,7	1,4
ATP	6,5	1,6
C	4,1	4,0
PC	4,6	1,9

Pro názornou ukázku vlivu pH pufru na separaci standardů jsou dále připojeny chromatogramy AMP při obou chromatografických podmínkách (Obr. 15 a 16).



Obr. 15: AMP (chromatografické podmínky e) 30% 5 mM octanový pufr, pH 3,5, 70% ACN).



Obr. 16: AMP (chromatografické podmínky f) 30% 5 mM octanový pufr, pH 6,0, 70% ACN).

Během následujícího hledání optimálních podmínek pro současnou analýzu všech látek byl používán pufr bez úpravy pH (tedy o síle pH 6). Dále bylo měněno procentuelní složení jednotlivých složek mobilní fáze:

- 30% 5 mM octanový pufr, pH 6,0, 70% ACN,
- 20% 5 mM octanový pufr, pH 6,0, 80% ACN,
- 15% 5 mM octanový pufr, pH 6,0, 85% ACN.

Při separaci směsi za daných podmínek by již nedocházelo k hromadné koeluci analytů, jak tomu bylo zpočátku. Nicméně problémem stále zůstává koeluce vzorku kreatinu s ADP a PC s ATP.

Z těchto tří obměn složení mobilní fáze bylo nejlepších výsledků dosaženo při podmínkách 5 mM octanový pufr, pH 6,0, 80% ACN. Při použití 85% ACN v mobilní fázi byla celková doba analýzy příliš dlouhá.

Vzhledem k dosud ne příliš úspěšným změnám chromatografických podmínek byla další pozornost zaměřena na možnost ovlivnění retence analytů pomocí změny síly pufru. Při následujících analýzách byly zachovány podmínky, které se zdály být zatím nejlepší (tzn. pH 6,0, 80% ACN) a byla měněna pouze síla pufru:

g) 20% 5 mM octanový pufr, pH 6,0, 80% ACN,
h) 20% 10 mM octanový pufr, pH 6,0, 80% ACN,
i) 20% 20 mM octanový pufr, pH 6,0, 80% ACN.

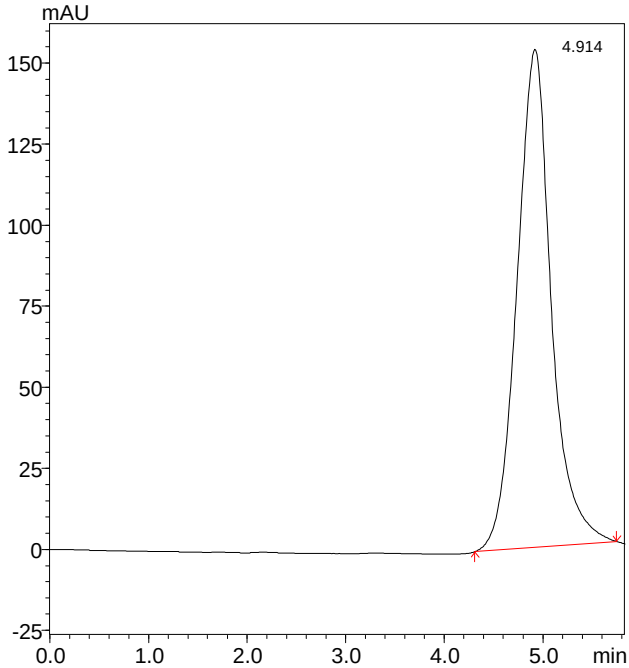
Z naměřených hodnot retenčních časů (viz Tabulka č. 3) lze konstatovat, že při slabší síle pufru měly píky poměrně pravidelné tvary, ale při vzájemném proložení chromatogramů bylo zjištěno, že se některé analyty opět překrývají a že by tedy nebylo možné při těchto podmínkách separovat jejich směs.

Při použití pufru o síle 20 mM téměř nedocházelo k překrývání jednotlivých píků, nicméně při této síle byl nevyhovující jejich tvar, který znemožňoval případnou kvantitativní analýzu.

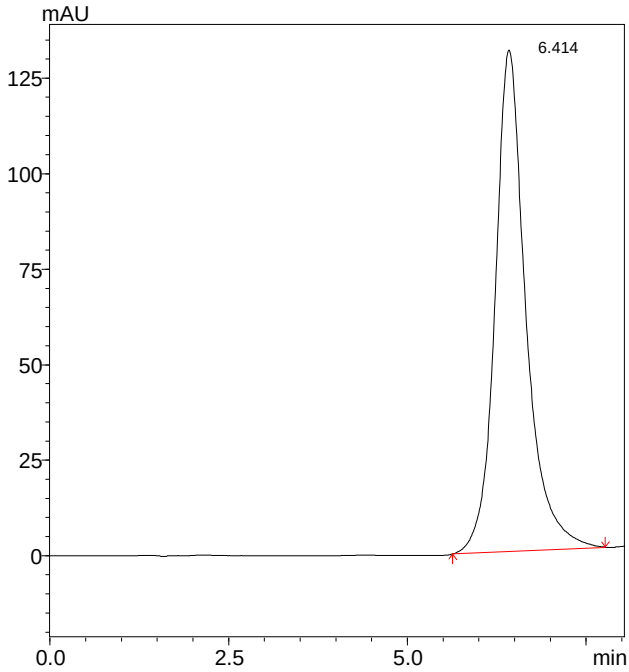
Tabulka č. 3

Analyzovaná látka	R_t při podmínkách g)	R_t při podmínkách h)	R_t při podmínkách i)
AMP	4,9	6,4	11,6
ADP	12,6	18,7	31,7
ATP	19,1	28,6	45,8
C	10,0	9,6	9,9
PC	15,9	25,0	37,8

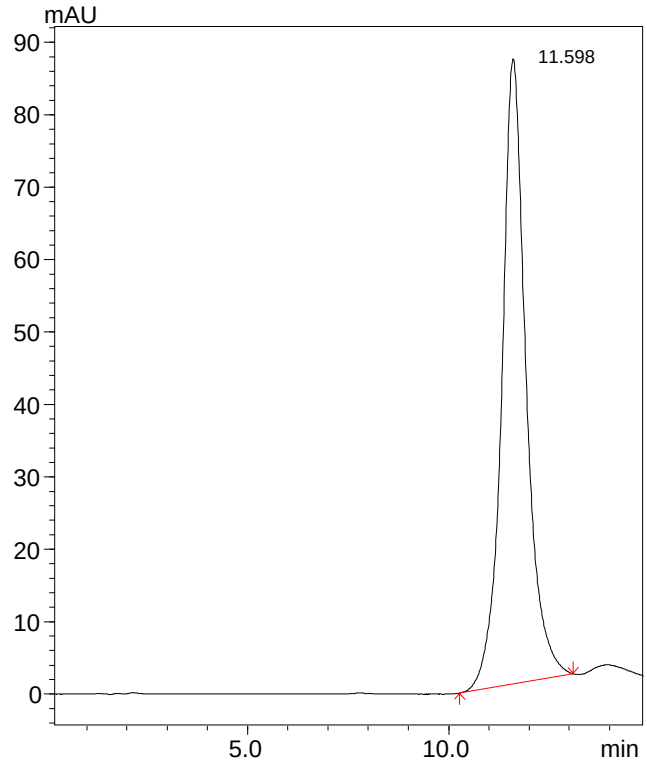
Na přiložených chromatogramech AMP při výše zmíněných chromatografických podmínkách (Obr. 16, 17, 18) lze demonstrovat zákonitosti, které byly již dříve uvedeny. A sice, že silnější pufr má za následek prodloužení doby analýzy a jednotlivých retenčních časů. A také, že se stoupající silou pufru se zhoršuje tvar píku, který začíná chvostovat.



Obr. 16: AMP (chromatografické podmínky g) 20% 5 mM octanový pufr, pH 6,0, 80% ACN).



Obr. 17: AMP (chromatografické podmínky h) 20% 10 mM octanový pufr, pH 6,0, 80% ACN).



Obr. 18: AMP (chromatografické podmínky i) 20% 20 mM octanový pufr, pH 6,0, 80% ACN).

Bylo provedeno poměrně velké množství dalších analýz, při kterých byly systematicky kombinovány různé chromatografické podmínky, ať už pH, síla pufru nebo podíl ACN. Bohužel však žádné z dalších měření neposkytlo lepší výsledky než ta, která zde byla zmíněna. Z tohoto důvodu nejsou na tomto místě tyto analýzy podrobněji diskutovány.

Při další úpravě chromatografických podmínek byl použit mravenčan amonný. Nově byl k dříve analyzovaným látkám přidán navíc cyklický adenosinmonofosfát. Ale jak se dalo očekávat, změnou pufru se nepodařilo vyřešit problém přetrvávající koeluce některých analytů. Nutno podotknout, že přidání dalšího analytu – cAMP nevedlo k jeho koeluci s některou z již analyzovaných látek. Cyklický adenosinmonofosfát byl ze všech analytů na koloně nejméně zadržován a vždy eluován jako první v pořadí. Jeho pík se v žádném z následujících měření nepřekrýval s píkem jiného standardu. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při těchto podmínkách:

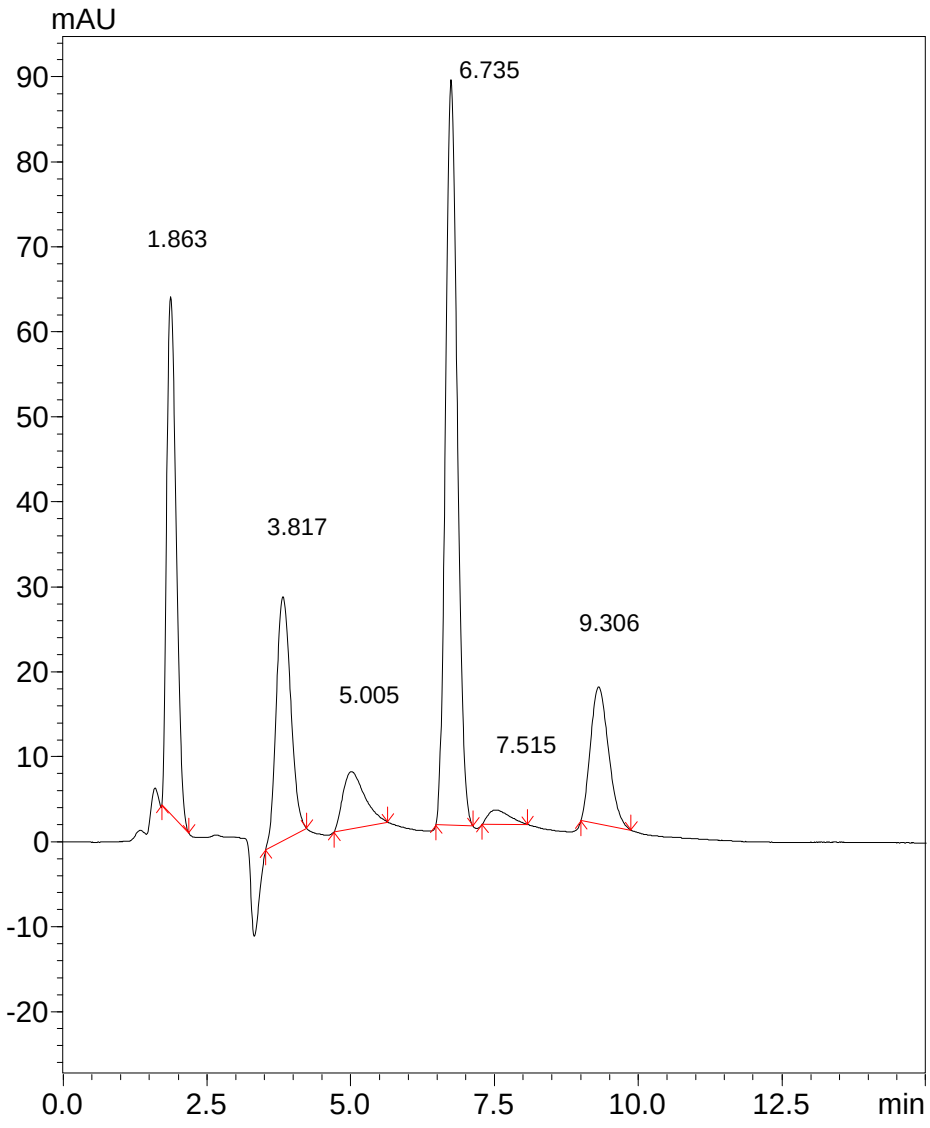
j) 25% 10 mM mravenčanový pufr, pH 6,2, 75% ACN.

Získané hodnoty retenčních časů (viz Tabulka č. 4) jsou z dosud provedených analýz asi nejpříznivější, zdá se, že by nemuselo docházet k tak výrazné koeluci jednotlivých složek při nástřiku směsi.

Tabulka č. 4

Analyzovaná látka	R_t při podmínkách j)
cAMP	1,9
AMP	3,8
ADP	5,0
ATP	7,7
C	6,7
PC	9,4

Na následujícím chromatogramu (Obr. 19) je záznam nástřiku směsi standardů za stejných podmínek.



Obr. 19: Směs standardů v pořadí cAMP, AMP, ADP, C, ATP, PC (chromatografické podmínky j) 25% 10 mM mravenčanový pufr, pH 6,2, 75% ACN).

Při porovnání hodnot retenčních časů jednotlivých standardů v tabulce s hodnotami retenčních časů píků v chromatogramu lze s jistotou určit, který pík odpovídá které látce.

Porovnáním retenčních časů na chromatogramu a v tabulce je na první pohled patrné, že došlo ke změně retenčních časů jednotlivých analytů. Při opakovaných měřeních se tento jev opakoval, přičemž největší rozdíly byly zaznamenány u ATP a PC.

Vzhledem k tomu, že byla prakticky vyčerpána možnost změn chromatografických podmínek v režimu izokratické eluce, bylo rozhodnuto využít pro další vývoj vhodnějších podmínek gradientovou eluci.

Pro výchozí gradient 1 byla zvolena koncentrace organické složky 80%. Jako vodná složka byl ponechán mravenčan amonný. V průběhu gradientu se množství acetonitrilu v mobilní fázi snížilo až na 60% a po určité době se vrátilo k výchozím 80%. Přesný průběh gradientu je popsán v kapitole 4.3.1.

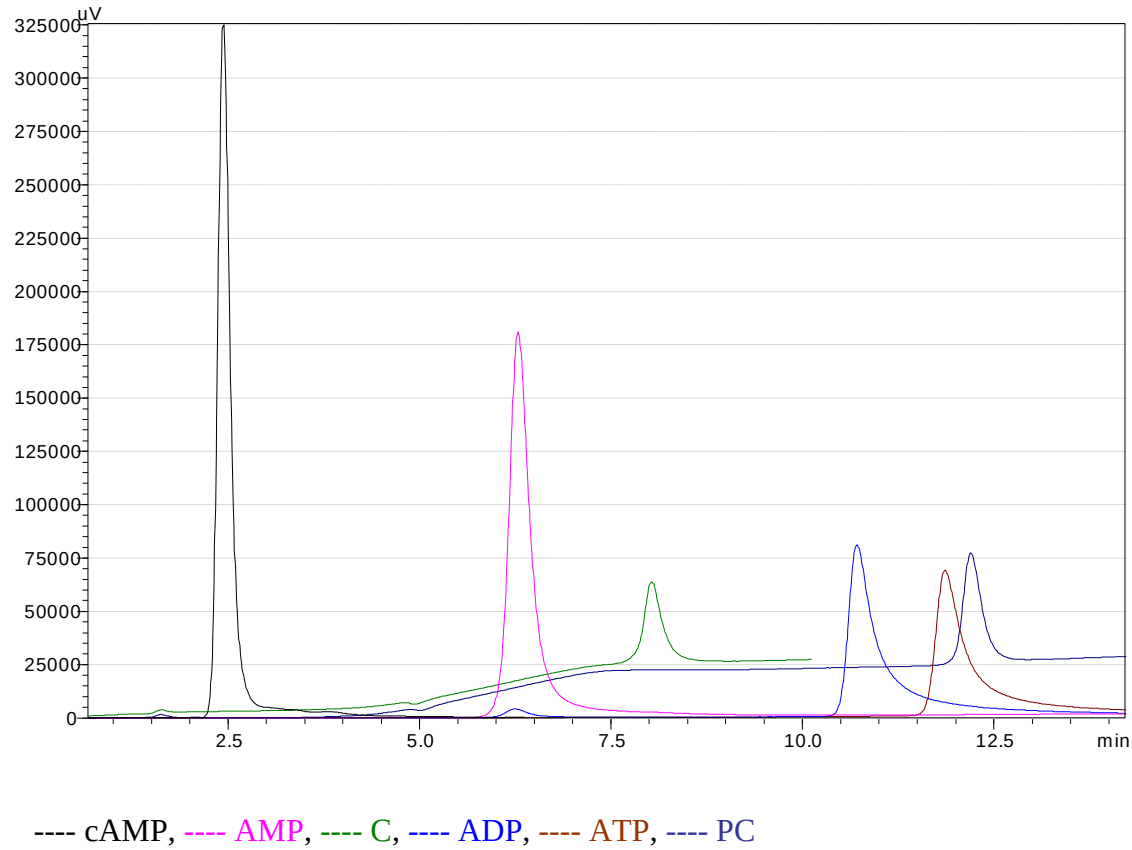
Analýza byla prováděna za těchto podmínek:

k) 10 mM mravenčanový pufr, pH 6,5, gradient 1.

Naměřené hodnoty retenčních časů (viz Tabulka č. 5) se zdály být velmi uspokojivé. Při proložení jednotlivých chromatogramů (viz Obr. 20) však bylo zjištěno, že v případě nástřiku směsi by stále docházelo ke koeluci ATP a PC. Nicméně tyto výchozí podmínky pro gradientovou eluci jsou dobré a jejich další úprava by mohla vést k úspěšnému oddělení všech stanovovaných látek.

Tabulka č. 5

Analyzovaná látka	R_t při podmínkách k)
cAMP	2,4
AMP	6,3
ADP	10,8
ATP	11,9
C	8,0
PC	12,2



Obr. 20: Proložené chromatogramy standardů v pořadí cAMP, AMP, C, ADP, ATP, PC (chromatografické podmínky: Gradient 1, 10 mM mravenčanový pufr, pH 6,5).

Další úprava gradientu 1 spočívala v prodloužení doby gradientu (viz gradient 2) a nebo naopak jeho zkrácení (viz gradient 3). Nicméně ani jedna z těchto obměn nevedla ke zlepšení separace. V gradientu 4 pak bylo sníženo množství organické složky v mobilní fázi, v gradientu 5 naopak zvýšeno, avšak ani jedna z alternativ nebyla opět úspěšná.

Pro další měření byl použit 20 mM mravenčanový pufr o pH 6,5 a chromatografické podmínky gradientu 1, nicméně ani zde jsme nezískali požadovanou separaci. Koeluce některých analytů byla dokonce větší než v případě použití 10 mM pufru při stejných podmínkách. Z tohoto důvodu byl silnější pufr vyřazen z dalších gradientových analýz. Z předchozích výsledků izokratických analýz se zdá být pravděpodobné, že užití slabšího než 10 mM pufru by nevedlo ke zlepšení separace a to díky snížení retence i zhoršení rozlišení mezi píky jednotlivých analytů.

Dosud nejlepšího oddělení jednotlivých látek tak bylo dosaženo při gradientu 1. Výsledky získané po prvním měření se bohužel nepodařilo zcela reprodukovat. Podobně jako v předchozích případech docházelo při opakovaných analýzách k posunu retenčních časů analytů.

V další fázi práce byla hlavní pozornost věnována zlepšení reprodukovatelnosti analýz. Byl diskutován fakt, že přestože používáme 10 mM pufr, jeho koncentrace na koloně se v průběhu gradientové eluce mění a nikdy ve skutečnosti této hodnoty nedosahuje. Zpočátku gradientu, kdy je nastřikováno pouze 20% pufru je dokonce síla pufru na koloně pouhé 2 mM, v průběhu gradientu se zvyšuje na 4 mM. V následujících analýzách proto byly změněny podmínky tak, aby síla pufru na koloně byla v průběhu celého gradientu stejná. Byl připraven 2 mM mravenčanový pufr a 2 mM mravenčanový pufr v 90% ACN. Výchozí chromatografické podmínky pak byly následující:

- 2 mM mravenčanový pufr, pH 6,45 se mísil s 90% ACN + 2 mM mravenčanový pufrem dle gradientu 8

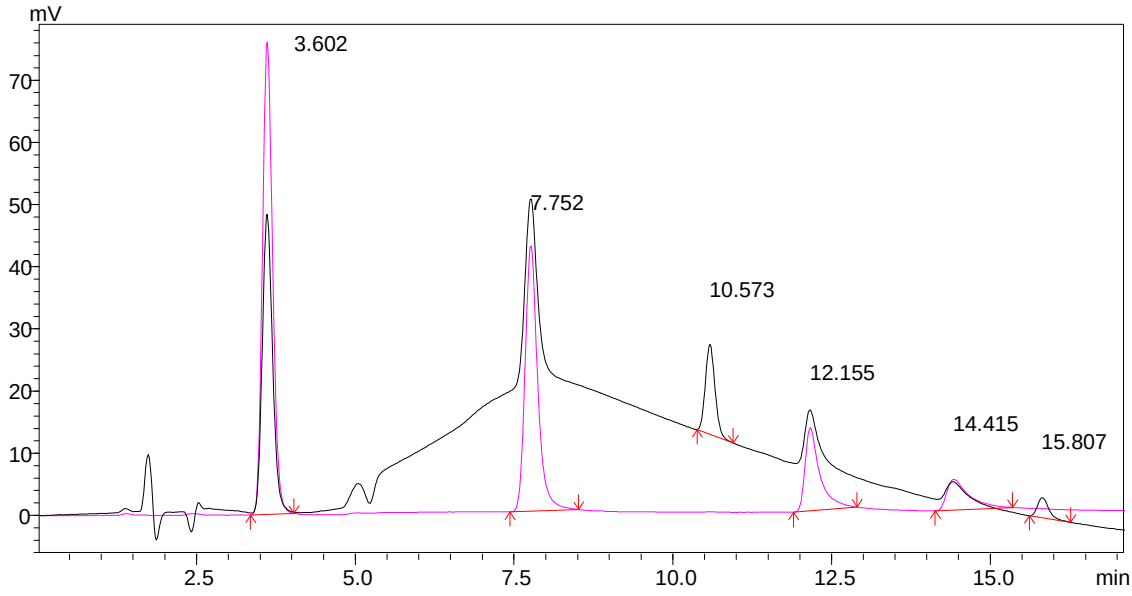
Ale ani v tomto případě však nedošlo k úplnému rozdělení stanovovaných látek a ani zde se nepodařilo získaná data úspěšně reprodukovat. Při takto nastavených podmínkách navíc docházelo k výraznému nárůstu nebo naopak poklesu základní linie, což vedlo k problémům zejména při detekci při 220 nm. Proto byl profil gradientu dále měněn, tak aby byl snížen podíl organické složky v průběhu analýzy. Za těchto podmínek byly výsledné hodnoty retenčních časů nejlepší (viz Tabulka č. 6), došlo také ke snížení nárůstu základní linie:

l) 2 mM mravenčanový pufr, pH 6,45 byl mísen s 90% ACN + 2 mM mravenčanový pufr dle gradientu 9.

Tabulka č. 6

Analyzovaná látka	R_t při podmínkách l)
cAMP	3,6
AMP	7,8
ADP	12,2
ATP	14,4
C	10,6
PC	15,8

Chromatografický záznam za použití nejlepších chromatografických podmínek je na následujícím Obr. 21.



Obr. 21: Směs standardů v pořadí cAMP, AMP, C, ADP, ATP, PC (chromatografické podmínky l) 2 mM mravenčanový pufr, pH 6,45 byl mísen s 90% ACN + 2 mM mravenčanový pufr dle gradientu 9).

Při opětovném měření za použití stejných chromatografických podmínek však byly opět získány odlišné hodnoty retenčních časů. Při dalším šetření příčiny špatné reprodukovatelnosti bylo zjištěno, že v průběhu času dochází k drobnému zvyšování pH mobilní fáze. Avšak i přes důslednou kontrolu pH se nepodařilo výsledky zcela

reprodukovat, a to ani po 2–3 hodinové ustalování. Bylo vyzkoušeno i promytí kolony několika sériemi daného gradientu před vlastním nástřikem vzorku látky, bohužel ani toto opatření nevedlo k zlepšení reprodukovatelnosti analýz. Posun retenčních časů při různých měřeních byl nejvíce patrný u ATP, ADP, PC. Zdá se tedy, že přítomnost fosfátů v molekule analytů bude zřejmě zodpovědná za špatnou opakovatelnost retenčních časů. Můžeme usuzovat, že zřejmě dochází k vzájemné interakci fosfátů a stacionární fáze, která má za následek různě silnou retenci stanovované látky a ztíženou reprodukovatelnost naměřených výsledků.

Z důvodu špatné reprodukovatelnosti jsme se rozhodli v gradientové eluci dále nepokračovat, přestože byly nalezeny podmínky, při kterých došlo k nejlepší separaci jednotlivých složek směsi analytů.

6 ZÁVĚR

V této diplomové práci byl popsán postupný vývoj vhodných chromatografických podmínek pro separaci ATP, ADP, AMP, cAMP, C a PC v HILIC módu. Nejprve byla okrajově popsána neúspěšná separace na koloně Obelisc N. Následně vývoj chromatografických podmínek za použití kolony ZIC®-HILIC. Cílem práce bylo vyvinout takové podmínky, které by umožnily současnou separaci všech stanovovaných látek – tedy jejich kvalitativní a následně i kvantitativní analýzu.

Od prvních měření jsme se potýkali s problémem koeluce, kdy zpočátku koeluovaly téměř všechny analyty. Během dalšího vývoje chromatografických podmínek pak docházelo pouze ke koeluci ATP a PC, kterou se nakonec podařilo také vyřešit. Podmínky izokratické eluce, za kterých se podařilo úspěšně separovat směs analytů byly následující: mobilní fáze byla tvořena z 25% 10 mM mravenčanovým pufrem o pH 6,2 a ze 75% acetonitrilem. Problémem těchto chromatografických podmínek byla špatná reprodukovatelnost retenčních časů.

Dále byly vyvinuty gradientové podmínky, za kterých se podařilo analyzované látky oddělit, i když ne všechny až na základní linii. Tyto podmínky byly následující: mobilní fáze se skládala ze složky A (2 mM mravenčanový pufr o pH 6,45), která se mísila se složkou B (90% acetonitril s přídavkem 2 mM mravenčanového pufru) v poměru dle gradientu 9. Průběh gradientu 9 byl následující: složení mobilní fáze bylo v čase nula 85 : 15 (B : A), do 15 minuty se změnilo na 70 : 30 (B : A), takto pět minut setrvalo a poté se postupně vrátilo k původním hodnotám. Detekce probíhala při 254 nm pro ATP, ADP, AMP, cAMP a při 220 nm pro C a PC. Při těchto podmínkách se ale bohužel nepodařilo zcela reprodukovat výsledné hodnoty retenčních časů daných látek. Při dalších měřeních docházelo k posunu retenčních časů, přestože byly použity naprosto identické podmínky, identická mobilní fáze i vzorky.

Špatná reprodukovatelnost je pravděpodobně způsobena fosfátovými skupinami, které analyty obsahují. Největší posuny retenčních časů byly naměřeny u ATP, ADP, PC, ale také u AMP, cAMP, nikoliv však u C, který žádný fosfát neobsahuje.

Závěrem lze konstatovat, že i když se podařilo dosáhnout separace všech analytů na ZIC®-HILIC analytické koloně, špatná reprodukovatelnost analýz znemožňuje další využití těchto podmínek pro původně zamýšlenou analýzu vzorků biologického materiálu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:

[1] Karlíček R. a kol., Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2001.

[2] Klimeš J. a kol., Kontrola léčiv 1, Karolinum, Praha 2002.

[3] Tesařová E., učební text: Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, Přírodovědecká fakulta UK v Praze, http://web.natur.cuni.cz/~tesarove/hplc.pdf 02/2010.

[4] Ústav technologie ropy a alternativních paliv, VŠCHT, sekce výzkum: http://cesmina.vscht.cz/trp/index.php/vyzkum/technicke-vybaveni/38-vybaveni-pro-vysokouinnou-kapalinovou-chromatografii 02/2010.

[5] Biochemical Page, Separační metody – Chromatografie, http://biochemie.sweb.cz/x/metody/chromatografie.htm#rozdelovaci 03/2010.

[6] Wikipedie otevřená encyklopedie, http://cs.wikipedia.org/wiki/Hlavn%C3%AD_strana 02-03/2010.

[7] Vávrová J., text dostupný z http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd_ds4/hypertext/AJALB.htm 02/2010.

[8] Douša M., www.hplc.cz 02/2010.

[9] Kazakevich Y., McNair H. M., Basic Liquid Chromatography (online Textbook on HPLC – http://hplc.chem.shu.edu/HPLC/index.html 03/2010).

[10] Kvasnicová V., Chromatografie, Učební texty 3.LF UK.

[11] Šíma J., Separační analytické metody – část I, Biologická fakulta Jihočeské Univerzity, http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separa.htm 03/2010.

[12] Linden J. C., Lawhead C. L., J. Chromatogr. 105 (1975) 125-133.

[13] Palmer J. K., Anal. Lett. 8 (1975) 215-224.

[14] Hemström P., Irgum K., J. Sep. Sci. 29 (2006) 1784-1821.

[15] Appelblad P., Jonsson T., Pontén E., Viklund C., Jiang W., A practical guide to HILIC 2008, Merck SeQuant AB, ISBN 978-91-631-8370-6.

[16] Zhou T., Lucy Ch. A., J. Chromatogr. A. 1187 (2008) 87-93.

[17] Vacek J., Onofrejová L., Klejdus B., Kubáň V., Chem. Listy 5 (2009) 381-385.

[18] McClintic C., Remick D. M., Peterson J. A., Risley D. S., J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 26 (2003) 3093-3104.

[19] West C., Lesellier E., J. Chromatogr. A. 1110 (2006) 200-213.

[20] Neue U., HPLC Columns – Theory, Technology and Practice, Wiley-VCH, New York 1997, 176-177, 217-223.

[21] Guo Z. M., Lei A. W., Zhang Y. P., Xu Q., Xue X. Y., Zhang F. F., Liang X. M., Chem. Commun. (2007) 2491.

[22] Han S. M., Biomed. Chromatogr. 11 (1997) 259-271.

[23] Pisano R., Breda M., Grassi S., James C. A., J. Pharm. Biomed. Anal. 38 (2005) 738-745.

[24] Idborg H., Zamani L., Edlund P. O., Schuppe-Koistinen I., Jacobsson S. P., J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 828 (2005) 14-20.

[25] Idborg H., Zamani L., Edlund P. O., Schuppe-Koistinen I., Jacobsson S. P., J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 828 (2005) 9-13.

[26] Kalina M., CHEMagazín 5 (2009) 21, Merck spol. s r.o.

[27] http://www.merck.cz/cs/index.html 03/2010.

[28] http://www.sequant.com/ 03/2010.

[29] http://www.labicom.cz/ 03/2010.

[30] Sielic, propagační leták Obelisc – LC Columns With Liquid Separation Cell Technology.

[31] http://www.sequant.de/ 02/2010.

[32] Langrock T., Czihal P., Hoffmann R., Amino Acids 30 (2006) 291-297.

[33] Yoshida T., J. Biochem. Biophys. Methods 60 (2004) 265-280.

[34] Kodíček M., Biochemické pojmy – výkladový slovník 2004, VŠCHT Praha, 80-7080-551-X.

[35] May P., Adenosine Triphosphate – ATP, Bristol university, http://www.bris.ac.uk/Depts/Chemistry/MOTM/atp/atp1.htm 02/2010.

[36] Vznik a význam ATP, http://www.gvi.cz/files/chemie/atp.pdf 02/2010.

[37] Chen Y., Xing D., Wang W., Ding Y., Du L., Biomed. Chromatogr. 21 (2007) 628-634.

[38] Buttgereit F., Brand M. D., Biochem. J. 312 (1995) 163-167.

[39] Erecinska M., Silver I. A., J. Cereb. Blood Flow Metab. 9 (1989) 2-19.

[40] Burnstock G., Pharmacol. Rev. 58 (2006) 58-86.

[41] Coolen E. J. C. M. et al., J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. 864 (2008) 43-51.

[42] Di Virgilio F., Ferrari D., Idzko M., Panther E., Norgauer J., La Sala A., Girolomoni G., Drug Dev. Res. 59 (2003) 171.

[43] Bours M. J., Swennen E. L., Di Virgilio F., Cronstein B. N., Dagnelie P. C., Pharmacol. Ther. 112 (2006) 358-404.

[44] Agteresch H. J., van Rooijen M. H. C., van den Berg J. W. O., Minderman-Voortman G. J., Wilson J. H. P., Dagnelie P. C., Drug Dev. Res. 60 (2003) 196.

[45] Yamada T., Okajima F., Akbar M., Tomura H., Narita T., Yamada T., Ohwada S., Morishita Y., Kondo Y., Oncol. Rep. 9 (2002) 113-117

[46] Conigrave A. D., van der Weyden L., Holt L., Jiang L., Wilson P., Christopherson R. I., Morris M. B., Biochem. Pharmacol. 60 (2000) 1585-1591.

[47] Vokurka M., Hugo J. a kol., Velký lékařský slovník 2009, 8. vydání, ISBN 978-80-7345-166-0.

[48] Jánský P., Farmakoterapie 5 (2005) 477-481.

[49] Souhrn údajů o přípravku Plavix, MV-AISLP, verze 2010.2.

[50] McGregor R. A. et al, Nucleotide compounds that block the bitter taste of oral compositions, http://www.google.com/patents?vid=USPAT6942874&id=5a0VAAAAEBAJ&dq=6942874, 03/2010.

[51] Bitter blocker backed by FDA 2004, http://www.drugresearcher.com/Research-management/Bitter-blocker-backed-by-FDA, 03/2010.

[52] Schlattner U., Tokarska-Schlattner M., Wallimann T., Biochim. Biophys. Acta 2 (2006) 164–180.

[53] Souhrn údajů o přípravku Neoton, MV-AISLP, verze 2010.2.

[54] Hearse D. J., Cardiovasc. Res. 18 (1984) 384-390.

[55] Childs K. F., Ning X. H., Bolling S. F., J. Chromatogr. B. 678 (1996) 181-186.

[56] Pelzmann B., Hallstrom S., Schaffer P., Lang P., Nadlinger K., Birkmayer G. D., Vrecko K., Reibnegger G., Koidl B., Br. J. Pharmacol. 139 (2003) 749-754.

[57] Cordis G. A., Engelman R. M., Das D. K., J. Chromatogr. 386 (1987) 283-288.

[58] Jahraus A., Egeberg M., Hinner B., Habermann A., Sackman E., Pralle A., Faulstich H., Rybin V., Defacque H., Griffiths G., Mol. Biol. Cell 12 (2001) 155-170.

[59] Peveri P., Heyworth P. G., Curnutte J. T., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89 (1992) 2494-2498.

[60] Reichelova V., Albertioni F., Liliemark J., J. Chromatogr. B. 682 (1996) 115-123.

[61] Brown P. R., J. Chromatogr. 52 (1970) 257-272.

[62] Harmsen E., de Tombe P. P., de Jong J. W., J. Chromatogr. 230 (1982) 131-136.

[63] Webster D. R., Boston G. D., Paton D. M., J. Pharmacol. Methods 13 (1985) 339-350.

[64] Mora L., Sentandreu M. A., Toldrá F., J. Agric. Food Chem. 55 (2007) 4664-4669.

[65] Mussini E., Colombo L., Deponte G., Marcucci F, J. Chromatogr. 305 (1984) 450−455.

[66] Scott M. D., Baudendistel L. J., Dahms T. E., J Chromatogr. 576 (1992) 149-154.

[67] Ally A., Park G., J Chromatogr. 575 (1992) 19-27.

[68] Teerlink T., Hennekes M., Bussemaker J., Groeneveld J., Anal Biochem. 214 (1993) 278-283.

[69] Volonté M. G., Yuln G., Quiroga P., Consolini A. E., J. Pharm. Biomed. Anal. 35 (2004) 647-653.