Abstrakt

V rigorózní práci byla vyvinuta nová HPLC metoda pro současné stanovení neopterinu, tryptofanu, kynureninu a kreatininu v krevním séru a následně byla metoda plně validována.

Pro separaci byly použity dvě sériově zapojené monolitní kolony Chromolith Speed ROD RP-18e, 50 x 4,6 mm a Chromolith Performance RP-18e, 100 x 3,0 mm. Ke zlepšení separační účinnosti a odstranění rušivých proteinů séra byla před sériové zapojení kolon přidána předkolona Chromolith Guard RP-18e, 10 x 4,6 mm. Neopterin a tryptofan byly detekovány fluorescenčním detektorem. Pro detekci neopterinu byla použita excitační vlnová délka 353 nm a emisní 438 nm, tryptofan byl detekován při excitační vlnové délce 245 nm a emisní 404 nm. Detekce kreatininu a kynureninu byla prováděna pomocí diode array detektoru při vlnových délkách 235 nm pro kreatinin a 230 nm pro kynurenin.

Mobilní fází byl 15 mmol/l fosfátový pufr o pH 4,51 s průtokem 1 ml/min v čase 0 - 3 minuty, poté byl průtok skokově zvýšen na 2,3 ml/min. Celková doba analýzy byla 9,5 minuty. Nástřik vzorku na kolonu byl 1 µl.

Metoda byla vypracována a validována se standardy stanovovaných analytů a pomocí lidského krevního séra.