

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV



HILIC separace acikloviru a jeho degradačního
produktu

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

Konzultant: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Hradec Králové, 2016

Lucie Bouzková

„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. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové, 16. května 2016

.....

Lucie Bouzková

Na tomto místě bych ráda poděkovala mé školitelce PharmDr. Pavle Pilařové, Ph. D. za odborné vedení, ochotu a vstřícnost při vypracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat panu doc. PharmDr. Radimovi Kučerovi, Ph. D. za odborné konzultace a připomínky k práci na experimentální části. V neposlední řadě děkuji také všem pracovníkům katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv za vytvoření kvalitního pracovního prostředí.

Tato práce vznikla za podpory projektu SVV 260 291.

Obsah

Abstrakt	6
Abstract	7
1. Úvod	8
2. Cíl práce	9
3. Teoretická část	10
3.1 Aciklovir a jeho vlastnosti	10
3.1.1 Vzorec a chemické vlastnosti	10
3.1.2 Farmakologické vlastnosti.....	11
3.1.3 Klinické údaje.....	13
3.1.4 Lékové formy	15
3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	16
3.2.1 Princip HPLC	16
3.2.2 Kapalinový chromatograf.....	17
3.2.3 Způsoby HPLC separace	18
3.2.4 Stacionární fáze	25
3.2.5 Detekční zařízení	28
3.2.6 Základní teoretické aspekty HPLC.....	33
3.3 Chromatografické podmínky HILIC analýzy uvedené v literatuře.....	37
4. Experimentální část	38
4.1 Přístroje, chemikálie a pomůcky	38
4.1.1 Chromatografický systém.....	38
4.1.2 Chemikálie.....	38
4.1.3 Přístroje.....	38
4.1.4 Pomůcky	39
4.2 Obecné postupy	40
4.2.1 Příprava vzorků pro analýzu.....	40

4.2.2 Příprava roztoků	40
4.2.3 Příprava mobilní fáze	40
4.3 Optimalizace podmínek HPLC separace	42
4.3.1 Přednastavení HPLC chromatografu	42
4.3.2 Chromatografické podmínky	42
4.3.3 Vliv chromatografických podmínek na retenci ACI a GUA	42
5. Výsledky a diskuze	44
5.1 Vliv teploty a koncentrace octanu amonného na retenci	44
5.2 Vliv koncentrace octanu amonného	46
5.3 Vliv pH mobilní fáze na retenci	47
5.4 Vliv molarity trifluoroctové kyseliny na retenci	48
5.5 Vliv změny poměru vodné a organické složky	51
5.6 Vliv změny pH u 0,5 mM mobilní fáze	53
5.7 Vliv změny poměru ACN a MeOH mobilní fázi	56
6. Závěr	58
7. Seznam obrázků	59
8. Seznam tabulek	60
9. Seznam grafů	60
10. Seznam použitých zkratk	61
11. Seznam použité literatury	63

Abstrakt

Univerzita Karlo v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Kandidát: Lucie Bouzková

Školitel: PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

Název diplomové práce: HILIC separace acikloviru a jeho degradačního produktu

Tato práce byla zaměřena na testování retenčního chování acikloviru a jeho degradačního produktu guaninu na zirkoniové koloně potažené elementárním uhlíkem - ZirChrom[®]CARB s využitím hydrofilní interakční kapalinové chromatografie (HILIC). Práce vychází z předešlé studie na stejné koloně, která se zabývala HILIC analýzou polárních sloučenin a xantinů, které jsou strukturně podobné sledovaným látkám. V této práci byly sledovány různé faktory, které ovlivňovaly retenci analytů. Byl popsán vliv teploty, koncentrace octanu amonného a trifluorooctové kyseliny, pH a změny složení mobilní fáze na retenci analytů. Se zvyšující se teplotou klesala retence obou analytů. Přítomnost octanu amonného jako Lewisovy baze v mobilní fázi vytváří soutěž o vazebná místa typu Lewisových kyselin na povrchu zirkoniové kolony. Při vyšší koncentraci octanu amonného se retence analytů snižuje a na mechanismu separace se podílí uhlíková vrstva na povrchu stacionární fáze. S přidavkem methanolu do mobilní fáze se retence obou analytů snižuje oproti mobilní fázi bez methanolu a zároveň se také zlepšuje symetrie píků acikloviru a guaninu. Princip separace je charakterizován jako komplexní mechanismus, na kterém se podílejí hydrofobní a hydrofilní interakce a pravděpodobně výměna ligandů.

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Pharmaceutical chemistry and Drug Control

Candidate: Lucie Bouzková

Tutor: PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

Title of Thesis: HILIC separation of acyclovir and its degradation product

This thesis was aimed to test the retention behavior of acyclovir and its degradation product guanine on zirconia-based column with carbon layer - ZirChrom®CARB under hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC). The thesis uses findings from previous paper done on the same column, which was aimed to analyze the retention under HILIC conditions of polar compounds and xanthenes, which structure are similar to our compounds. In this thesis the influence of temperature, concentration of ammonium acetate and trifluoroacetic acid, pH and various composition of mobile phase was studied. With increasing temperature the retention of analytes has decreased. Presence of ammonium acetate as a Lewis base in mobile phase develops a competition for binding Lewis acids sites on the surface of zirconia column. With higher concentration of ammonium acetate the retention of analytes decreases and the carbon layer participates in the mechanism of the separation. The retention of both analytes decreases with the addition of methanol to the mobile phase, contrary to the mobile phase without the added methanol. Also the peaks symmetry of acyclovir and guanine is better with the methanol addition. The process of separation is described as a complex mechanism that most likely involved the ligand exchange, hydrophobic and hydrophilic interaction was involved in the retention of the analytes.

1. Úvod

Moderní farmacie se v dnešní době neobejde bez účinného analytického nástroje, který je aplikován ve většině farmaceutických odvětví. Tímto nástrojem se stala vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). HPLC našla uplatnění ve vývoji, kontrole a výrobě léčiv. Slouží jak k identifikaci a separaci látek, tak i k jejich kvantitativní analýze. Výhody HPLC analýz jsou především rychlost, citlivost a možnost automatizace s potřebou jen malého množství vzorku.

Pokrok ve vývoji léčiv tvoří nerozlučnou dvojici s pokrokem v technologii a vývoji nových analytických metod. Celý proces je poháněn zvyšující se poptávkou o co nejvíce efektivní, rychlou a přesnou analýzu.

Zásadní vliv na vývoj nových metod pro HPLC analýzu mají stacionární fáze. Stacionární fáze na bázi silikagelu jsou bez debat nejpoužívanější a zároveň jsou to kolony první volby při optimalizaci podmínek pro nová stanovení. V posledním desetiletí však vstupují do popředí kolony na bázi kovových oxidů. Tyto stacionární fáze představují mnohem univerzálnější použití nejen v rozsahu extrémních hodnot pH (1-14) a teplot (až 200 °C), ale také ve své mechanické odolnosti. Oxid zirkoničitý a jeho různé povrchové modifikace např. Zr-PBD, Zr-PS nebo Zr-C, nabízejí jedinečnou selektivitu a retenci pro různorodé skupiny sloučenin. Tyto kolony je možné aplikovat na různé chromatografické systémy. Jedním z progresivních spojení se stala aplikace zirkoniových kolon na systém HILIC - hydrofilní interakční chromatografie. Tato metoda se stává oblíbenou díky svému použití v dříve neřešitelných problémech při separaci, jako např. společná analýza polárních a nepolárních analytů.

Aciklovir je antivirová léčivá látka, která je účinná při léčbě nemocí způsobených herpesviry, virem varicella zoster a virem Epstein-Barrové. Aktivuje se ve virem nakažené buňce na aciklovir-trifosfát a potlačuje syntézu virové DNA. Používá se k léčbě planých neštovic, oparů a infekcí vyvolaných virem HSV. Vyskytuje se jak v systémových aplikačních formách, tak i v lokální lékové formě. Jako nečistota nebo přesněji degradační produkt acikloviru lze mimo jiné označit guanin. Guanin je purinová báze v nukleotidech obsažena v DNA i RNA.

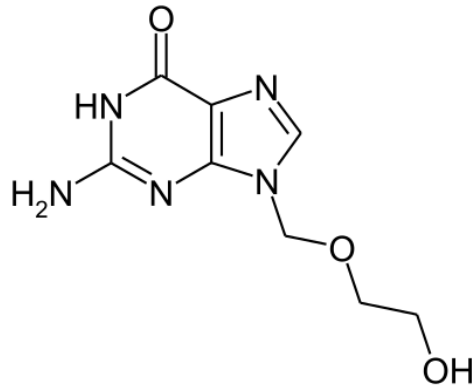
2. Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo testování retenčního chování acikloviru a jeho rozkladného produktu guaninu na zirkoniové koloně modifikované elementárním uhlíkem - ZirChrom[®]-CARB s využitím HILIC systému a nalezení vhodných podmínek pro separaci obou analytů. Práce vychází z předešlé studie na stejné koloně metodou HILIC zabývající se chováním polárních sloučenin a xanthinů, které jsou strukturně podobné sledovaným látkám.³⁰ Byly vytvořeny základní podmínky pro separaci, které se dále modifikovaly. Bylo sledováno různé složení mobilních fází při změně zastoupení množství organické a vodné složky. Dále byl pozorován vliv koncentrace octanu amonného a kyseliny trifluorocetové v mobilní fázi na eluci analytů. Mezi další faktory ovlivňující retenci bylo zkoumáno pH mobilní fáze a teplota separace.

3. Teoretická část

3.1 Aciklovir a jeho vlastnosti

3.1.1 Vzorec a chemické vlastnosti



Sumární vzorec: $C_8H_{11}N_5O_3$

Molekulová hmotnost (M_r): 225,21

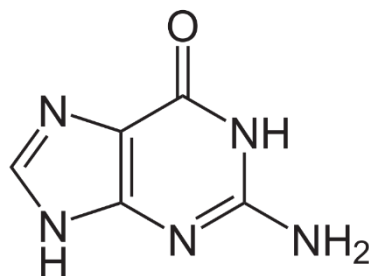
Systematický název: 2-amino-9-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-1,9-dihydro-6H-purin-6-on

Obsahuje 98,5 % až 101,0 % sloučeniny $C_8H_{11}N_5O_3$, počítáno na bezvodou látku.¹

Vlastnosti

Aciklovir je bílý krystalický prášek, těžce rozpustný ve vodě, velmi těžce rozpustný v ethanolu 96% a prakticky nerozpustný v heptanu. Rozpouští se v ředěných roztocích minerálních kyselin a alkalických hydroxidů. Bod tání se pohybuje v rozmezí mezi 256,5 a 257 °C.^{1,2}

Vlastnosti guaninu a jeho vzorec



Guanin je hlavní rozkladný produkt acikloviru. Jedná se o heterocyklickou, purinovou dusíkatou bazi. Guanin je téměř nerozpustný ve vodě, rozpouští se v ředěných roztocích minerálních kyselin a alkalických hydroxidů. Teplota tání je 360 °C.²

3.1.2 Farmakologické vlastnosti

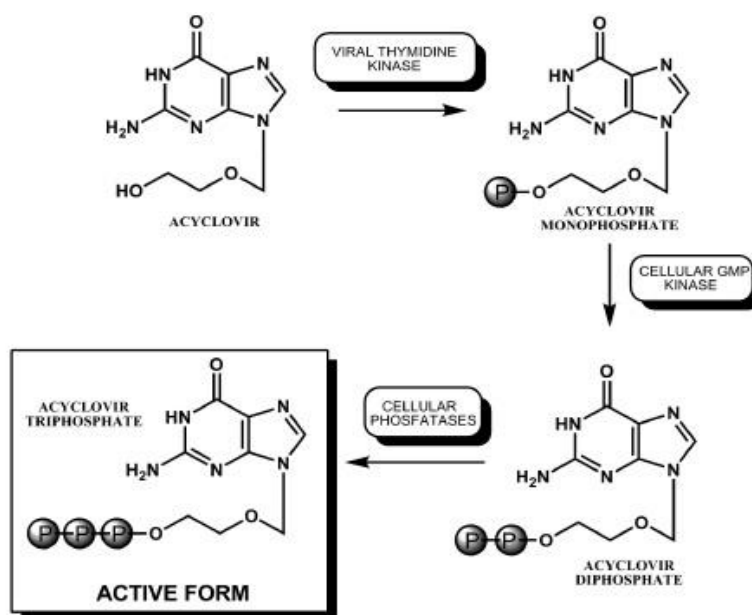
3.1.2.1 Farmakodynamické vlastnosti

Aciklovir je syntetický derivát guaninu účinný proti herpes simplex (HSV) typu 1 a 2, dále proti viru varicella zoster (VZV), cytomegaloviru (CMV) a viru Epstein-Barrové (EBV). V molekule má místo (deoxy)ribózy neobvyklý alifatický zbytek, proto ho také můžeme označit jako „acykloguanosin“. Aktivuje se jen v infikovaných buňkách a inhibuje v nich syntézu virové DNA.^{3,4,5}

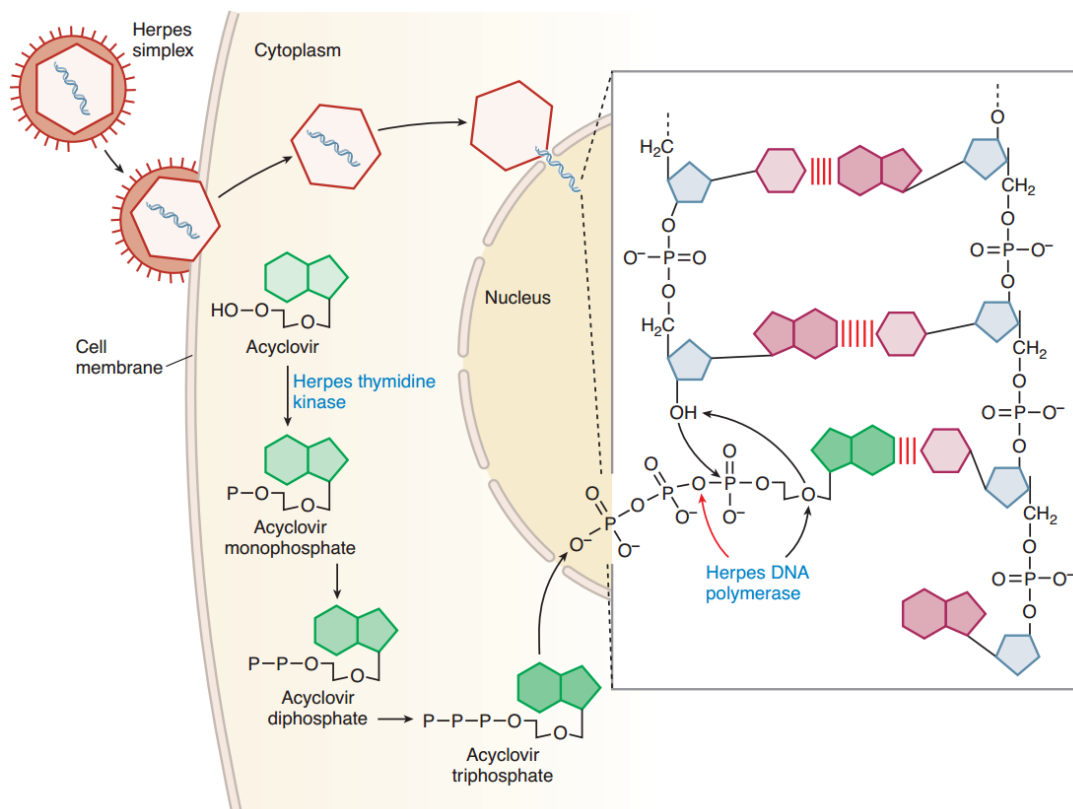
Aktivace a mechanismus účinku acikloviru

Aciklovir je postupně konvertován na aktivní metabolit aciklovir-trifosfát, který se kumuluje pouze ve virem infikovaných buňkách. První fosforylační reakcí vzniká aciklovir-monofosfát. Tuto reakci katalyzuje virová tymidinkináza, kterou kódují viry herpes simplex a herpes varicella-zoster. Aciklovir-monofosfát se dále přeměňuje buněčnými kinázami na trifosfát (obrázek č. 1). Polarita fosfátových zbytků znemožňuje molekule aciklovir-trifosfátu proniknout přes membránu, a proto se hromadí v infikované buňce.⁵ Aciklovir-trifosfát inhibuje replikaci virové DNA, funguje totiž jako inhibitor virové DNA-polymerázy a zároveň jako terminátor řetězce DNA, čímž zastavuje replikační aktivitu (obrázek č. 2).^{3,4,5}

Vysoká selektivita účinku je dána tím, že aciklovir nevyužívá enzym tymidinkinázu zdravých neinfikovaných buněk jako substrát.⁶



Obrázek č. 1: Aktivace acikloviru.⁷



Obrázek č. 2: Mechanismus účinku acikloviru.⁹

3.1.2.2 Farmakokinetické vlastnosti

Aplikační formy acikloviru mohou být perorální, intravenózní nebo lokální. Z gastrointestinálního traktu je variabilně a nekompletně absorbován. Biologická dostupnost se pohybuje kolem 15-30%.^{3,4}

Aciklovir se široce distribuuje do tělesných tekutin, včetně mozkomíšního moku a mateřského mléka. Koncentrace v likvoru je přibližně 50 % odpovídajících plazmatických koncentrací. Vazba acikloviru na plazmatické proteiny je poměrně nízká (9 až 33 %), proto lékové interakce vyvolané vytěšňováním z vazebných míst nejsou pravděpodobné.

Vylučuje se ledvinami, glomerulární filtrací a tubulární sekrecí v téměř nezměněné formě. Jediným významným metabolitem acikloviru je 9-karboxymethoxymethylguanin, který tvoří 5-15% renální clearance. Eliminační poločas je přibližně 2,5 hodiny u pacientů s normální funkcí ledvin. V případě ledvinové nedostatečnosti se plazmatický poločas prodlouží na více než 20 hodin. U pacientů s renální insuficiencí musí být dávky acikloviru sníženy.^{4,6,8,9}

3.1.3 Klinické údaje

3.1.3.1 Indikace

Aciklovir se v perorální lékové formě užívá k léčbě infekcí kůže a sliznic vyvolaných virem herpes simplex typu 1 a 2, včetně primární a recidivující genitální herpetické infekce, prevence recidiv vyvolaných virem herpes simplex u imunokompetentních pacientů, léčba infekcí virem varicella zoster a virem herpes zoster. Dále k léčbě pacientů s výrazným snížením imunitní reakce, zvláště s pokročilým AIDS onemocněním nebo u pacientů po transplantaci kostní dřeně.

Studie prokázaly, že včasné zahájení léčby pásového oparu aciklovirem má pozitivní efekt na bolest a může snížit incidenci postherpetické neuralgie.^{5,6,8,9}

Podávání acikloviru má velký terapeutický význam převážně u těžkých infekcí vyvolaných virem herpes simplex a zoster. V tomto případě se podává parenterálně 5-10mg/kg každých 8 hodin.⁴

U léčby infekcí způsobených virem herpes simplex se u dospělých obvykle podává 200 mg acikloviru pětikrát denně. Léčba trvá přibližně pět dní, při těžkých primárních infekcích je však nutné dobu léčby prodloužit. Dětem ve věku 2 let a starším se podávají stejné dávky jako dospělým, kojencům a dětem mladším 2 let by se měly podávat dávky odpovídající polovině dávek pro dospělé. U starších pacientů je třeba vzít v úvahu možnost snížení funkce ledvin, proto by se měla dávka upravit. Zároveň je nutné udržovat přiměřenou hydrataci.^{6,8}

Při léčbě infekcí varicella a herpes zoster u dospělých je nutné podávat dávky 800 mg acikloviru pětikrát denně, přibližně v intervalu 4 hodin. V léčbě se pokračuje po dobu sedmi dnů. U pediatrické populace od 6 let je léčba stejná jako u dospělých jedinců. Dětem od 2 do 6 let se podává 400 mg acikloviru čtyřikrát denně a dětem do 2 let 200 mg acikloviru také čtyřikrát denně. Doba léčby je přibližně pět dní. Pro přesnější výši dávky lze určit jako 20 mg acikloviru na 1 kg tělesné hmotnosti (dávka nesmí přesáhnout 800mg) podávaných čtyřikrát denně.^{6,8,9}

Aciklovir aplikovaný povrchově ve formě roztoku se také osvědčil pro léčbu herpetické keratitidy.³

Další terapeutické využití je u dětí, které trpí závažnými formami planých neštovic, podaný perorálně ve vysokých dávkách vede většinou k rychlému uzdravení (do 24 hodin).³

3.1.3.2 Kontraindikace

Používání acikloviru je u pacientů se známou hypersenzitivitou na tuto léčivou látku kontraindikováno.⁶

3.1.3.3 Interakce

Přípravky, které se vylučují stejným mechanismem jako aciklovir, tedy tubulární sekrecí, mohou při souběžném podávání s aciklovirem zvyšovat jeho plazmatické koncentrace. Probenecid a cimetidin zvyšují tímto mechanismem AUC (plochu pod křivkou plazmatické koncentrace) systémově podávaného acikloviru a snižují tak jeho renální clearance. A naopak aciklovir může snížit renální clearance léků, které se také vylučují aktivní tubulární sekcí, jako je například methotrexát.^{6,8,9}

Dle studie aciklovir s chlorhexidinem vykazuje in vitro synergický účinek při inhibici syntézy virové DNA. Další studie prokázala synergické působení acikloviru a vidarabinu na divoký typ viru HSV-1, HSV-2 a VZV.^{10,11}

3.1.3.4 Nežádoucí účinky

Po perorálním podání se může objevit bolest hlavy, závratě, bolesti břicha, průjem a zvracení. Přípravky pro lokální aplikaci jsou téměř bez nežádoucích účinků. Jen výjimečně se objevuje alergická reakce. U intravenózních přípravků se může velmi vzácně objevit reversibilní renální dysfunkce, neurotoxicita (např. agitace, třes, dezorientace) a psychické symptomy.^{3,4,9}

Studie prokázaly, že standární i vyšší dávky acikloviru rychlou infúzí zvyšují riziko renálního selhání. Krystaly acikloviru se vysráží v ledvinových tubulech a způsobí jejich obstrukci. Pomalou infúzí v průběhu jedné až dvou hodin v kombinaci s dostatečnou hydratací se toto riziko minimalizuje.^{9,12,13}

Dále bylo prokázáno, že zvyšování dávek acikloviru v závislosti na hmotnosti u lidí s obezitou nemá žádný terapeutický význam. Naopak se tím zvyšuje riziko výskytu nežádoucích účinků. Aciklovir se jen nepatrně váže na plazmatické proteiny a lipidy, proto by mělo být u obézních pacientů zachováno dávkování jako u pacientu s ideální váhou.^{13,14}

3.1.4 Lékové formy

Přípravky s účinnou látkou aciklovir se vyskytují v perorálních, intravenózních a topických lékových formách.

V České republice jsou registrované a zároveň aktivně obchodované tyto přípravky:¹⁵

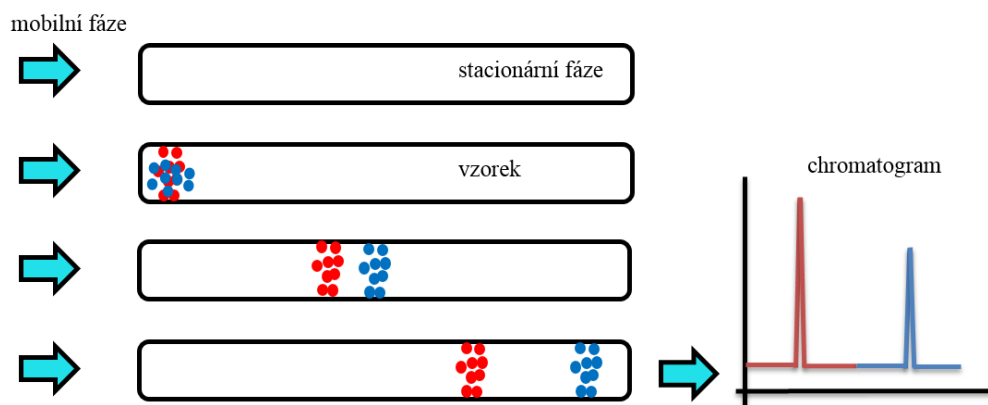
- Herpesin 200, por tbl nob 25 x 200 mg, Teva Pharmaceuticals CR, s.r.o., Praha, Česká republika
- Herpesin 400, por tbl nob 25 x 400 mg, Teva Pharmaceuticals CR, s.r.o., Praha, Česká republika
- Zovirax 200 mg, por tbl nob 25 x 200 mg, The Wellcome Foundation Ltd., Velká Británie
- Zovirax 400 mg, por tbl nob 70 x 400 mg, The Wellcome Foundation Ltd., Velká Británie
- Zovirax 800 mg, por tbl nob 35 x 800 mg, The Wellcome Foundation Ltd., Velká Británie
- Provirsan, por tbl nob 30 x 200 mg, PRO.MED.CS Praha a.s., Česká republika
- Acyclostad Galmed, drm crm 1 x 5 gm/250 mg, Stada Arzneimittel AG, Německo
- Aciklovir AL krém, drm crm 1 x 2 gm/100 mg, ALIUD PHARMA GmbH, Německo
- Herpesin krém, drm crm 1 x 2 gm 5%, drm crm 1 x 5 gm 5%, Teva Pharmaceuticals CR, s.r.o., Česká republika
- Zovirax 50 mg/g krém, drm crm 1 x 2 gm/100 mg, GlaxoSmithKline Consumer Healthcare, Velká Británie
- Zovirax Duo 50 mg/g + 10 mg/g krém, drm crm 1 x 2 gm, Beecham Group plc, obchodující jako: GlaxoSmithKline Consumer Healthcare, Velká Británie

3.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (anglicky *High Performance Liquid Chromatography* – HPLC) je separační analytická metoda velmi široce využívaná ve všech oblastech analýzy léčiv. Poskytuje jak kvalitativní, tak i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi. V moderním farmaceutickém průmyslu je nedílnou součástí většiny odvětví, jako jsou například výzkum, vývoj nebo výroba.^{16,17}

3.2.1 Princip HPLC

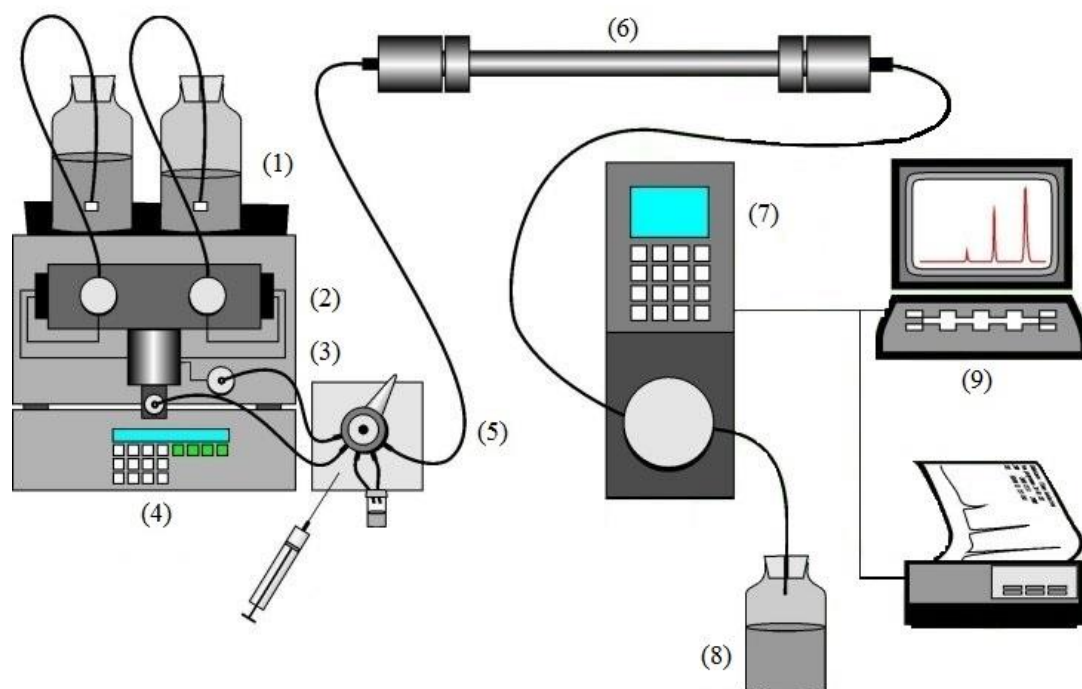
HPLC využívá rozdílné distribuce látek ve směsi mezi dvě nemísitelné fáze: mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou). Stacionární fáze je zakotvena v chromatografické koloně ve formě sorbentu. Mobilní fáze, která unáší separované látky, protéká tímto sorbentem. V průběhu procesu dochází k opakovanému ustalování rovnováhy dělených látek mezi mobilní a stacionární fází (obrázek č. 3). Mezi směsí látek a fázemi vznikají interakce, které umožňují separaci analytů. O separaci vzorku rozhodují jak vlastnosti separovaných složek a jejich afinita k mobilní a stacionární fázi, tak i vlastnosti obou fází.^{16,17,18,19}



Obrázek č. 3: Separace směsi dvou látek v chromatografickém systému.¹⁸

3.2.2 Kapalinový chromatograf

Schéma kapalinového chromatografu je uvedeno na obrázku č. 4. Nejčastěji se chromatograf skládá ze zásobníku mobilní fáze (1), ze kterého je vedena mobilní fáze přes odplyňovač (2) do vysokotlakého čerpadla (4). Toto uspořádání je běžné u isokratické eluce. Při gradientové eluci jsou jednotlivé složky mobilní fáze z více zásobníků míseny dle požadovaného poměru v programovací jednotce (3).



Obrázek č. 4: Schéma kapalinového chromatografu.²¹

Dále je dávkován roztok vzorku z dávkovacího zařízení (5), v současné době jsou daleko více využívány automatické dávkovače (autosampler). Vzorek je dál unášen mobilní fází na kolonu (6). V koloně dochází k rozdělení analytické směsi, které zaznamenává detektor (7). Detektor je přímo spojený s kolonou a za ním se někdy nachází sběrač jednotlivých frakcí (8), záleží na využití HPLC. Z detektoru je signál veden do počítače (9), který ho zpracuje a interpretuje výsledky analýzy pomocí chromatogramu. Počítač má také funkci řídicí, lze nastavovat a kontrolovat podmínky pro chromatografii, jako například objem nástřiků vzorku, průtokovou rychlost mobilní fáze, teplotu na koloně, maximální tlak pump, parametry detektoru, atd. ^{17,18,19,20}

3.2.3 Způsoby HPLC separace

Existují čtyři základní typy HPLC separace: na normálních fázích (NP - normal phase), na reverzních fázích (RP – reverse phase), iontově výměnná chromatografie (IEC – ion exchange chromatography), molekulová vylučovací chromatografie (SEC - size exclusion chromatography). Jednotlivé techniky separace jsou charakterizovány typem převládajících molekulárních interakcí. Je možno popsat tři základní molekulární interakce: polární interakce, které dominují u NP-HPLC, disperzí síly u RP-HPLC a elektrostatické interakce u IEC. Čtvrtý typ separace, charakteristický pro SEC, je založen na rozdělování molekul podle jejich velikosti, kde by už nemělo docházet k jiným interakcím. Další, velmi progresivní způsob HPLC analýzy, je metoda HILIC.^{16,20}

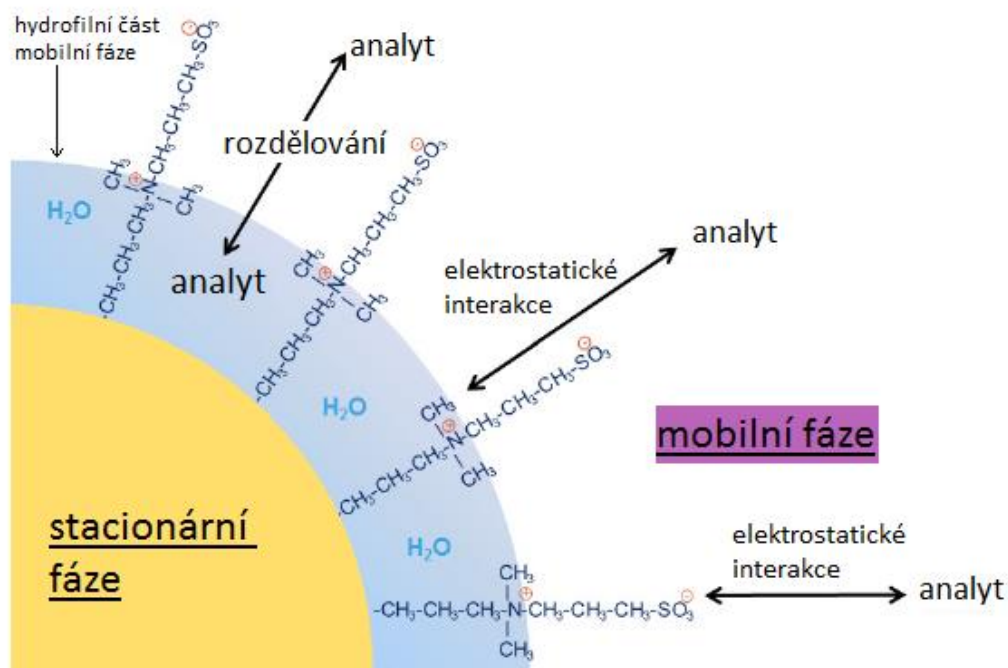
3.2.3.1 Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)

Hydrofilní interakční chromatografie (*Hydrophilic interaction liquid chromatography* – HILIC) popisuje způsob separace pro polární a hydrofilní sloučeniny. Akronym HILIC byl poprvé použit Alpertem v roce 1990 pro popis chromatografické metody, kde analyty interagují s hydrofilní stacionární fází. Mobilní fáze byla relativně hydrofobní binární směs s obsahem vodné složky jako silným elučním činidlem. Tato separační technika byla používána již od roku 1975 pro analýzu sacharidů a oligosacharidů.^{18,23,24,25}

Metoda HILIC využívá tradiční polární stacionární fáze jako HPLC na normálních fázích, ale mobilní fáze jsou podobné fázím, které se využívají u reverzní HPLC. HILIC také umožňuje analýzu nabitých látek jako v IEC chromatografii. Tato metoda má mnoho specifických výhod oproti konvenční NP - HPLC a RP - HPLC chromatografii. Například je možné analyzovat směs látek, které se eluují blízko mrtvého retenčního času u RP – HPLC. Polární látky se dobře rozpouštějí ve vodné části mobilní fáze používané v HILIC systému, což je výhoda oproti špatné rozpustnosti v mobilních fázích NP - HPLC. Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie se předně využívá pro nenabitě vysoce hydrofilní a amfifilní sloučeniny, které jsou příliš polární pro separaci na reverzních fázích, ale nemají dostatečný náboj pro IEC.^{24,25,26,28}

Mechanismus separace

Princip separace není zcela objasněn. Obecně se hovoří o komplexním způsobu separace, kde se uplatňují iontové interakce, vodíkové vazby, adsorpce a rozdělování analytu mezi hydrofobní část mobilní fáze a silně hydrofilní vrstvu vody, která se drží na povrchu polární stacionární fáze. Mechanismus rozdělování a elektrostatických interakcí je znázorněn na obrázku č.6.^{18,24,26}



Obrázek č. 5: Princip HILIC metody chromatografie s zwitteriontovou stacionární fází.²⁹

Stacionární fáze používané HILIC metodou

Stacionární fáze používané v HILIC systému můžeme členit do tří skupin, neutrální – bez elektrostatických interakcí, polární – silné elektrostatické interakce a zwitterionty – slabé elektrostatické interakce. Typickou stacionární fází je čistý nebo modifikovaný silikagel s polárními funkčními skupinami. Obvykle se používají stacionární fáze modifikované amidovou, diolovou a aminopropylovou skupinou. Silikagel s navázanou cyklodextrinovou skupinou se používá pro chirální HILIC separaci. Dalším typem stacionární fáze je sulfobetain, který patří mezi zwitterionty. Na povrchu těchto stacionárních fází se nachází silně kyselá sulfonová skupina a silně bazická kvarterní amoniová skupina, které jsou od sebe odděleny krátkým alkylovým řetězcem. Tyto skupiny jsou schopné adsorbovat vodu vodíkovými vazbami a vytvářet tak objemnou vrstvu vody na povrchu stacionární fáze, která řídí retenci. Na trhu jsou

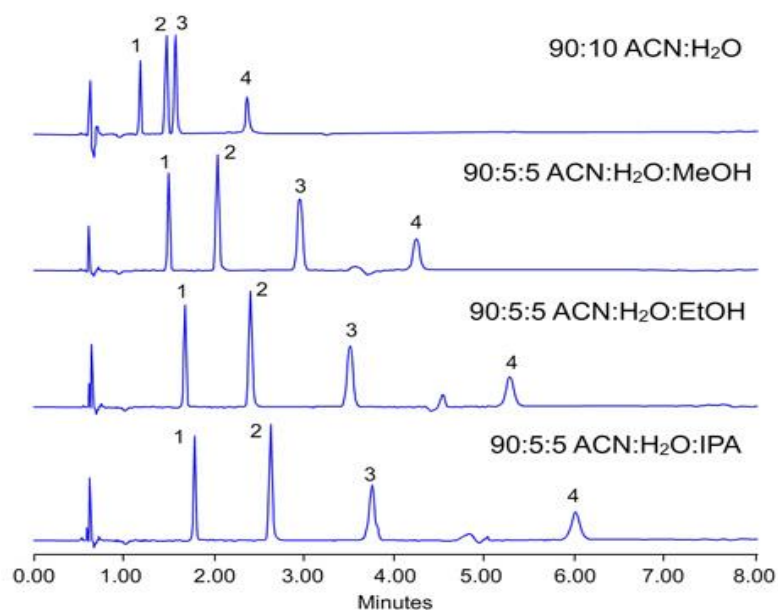
dostupné dva druhy zwitteriontových kolon, ZIC-HILIC (silikagelový nosič) a ZIC-pHILIC (polymerový nosič). V neposlední řadě se objevují stacionární fáze na bázi kovových oxidů (zirkoničitý a titaničitý), které vykazují větší tepelnou stabilitu a širší rozsah pH než stacionární fáze na bázi silikagelu.^{18,24,26,30,31}

Mobilní fáze pro HILIC separaci

Nejpoužívanější mobilní fází je směs vodou mísitelných organických rozpouštědel (např. acetonitril) s malým množstvím vody. V některých případech je možno vodu zcela nahradit jiným polárním rozpouštědlem (např. ethanol, methanol).^{18,23,24}

Selektivita HILIC separace

Selektivita silně závisí jak na stacionární fázi, tak i na mobilní fázi. Voda funguje jako eluent, proto i malé zvýšení koncentrace vody v mobilní fázi vede k výraznému snížení retence. Retence se snižuje s rostoucí polaritou mobilní fáze (zvýšení obsahu vody nebo pufru). Se zvyšující se koncentrací pufru (např. octan amonný) retence obvykle klesá. V HILIC systému má významný vliv na separaci i selektivitu rozpouštědlo vzorku. Vzorek rozpuštěný v rozpouštědle s vysokým obsahem vody způsobuje ztrátu účinnosti separace a snížení retence. Běžným organickým rozpouštědlem je acetonitril. Kompletně jinou selektivitu separace lze docílit změnou malého procenta acetonitrilu nebo vodné složky za jiné rozpouštědlo s vyšší eluční silou (obrázek č. 7).^{18,24,25}



Obrázek č. 6: Ovlivnění selektivity v HILIC systému změnou mobilní fáze.³²

Aplikace metody HILIC

HILIC separace kombinuje charakteristiky tří hlavních chromatografických modů a tím rozšiřuje škálu separačních možností v kapalinové chromatografii. O tuto metodu se v současné době jeví značný zájem, protože nachází řešení pro dříve obtížně řešitelné problémy, jako je separace malých organických kyselin, základních léčivých látek a mnoho dalších neutrálních a iontově nabitých látek. Metoda je úspěšně aplikována na analýzu sacharidů, peptidů a polárních léčiv. Techniku lze snadno kombinovat s různými detektory, jako například spektrofotometrické, refraktometrické, fluorescenční a hmotnostně spektrometrické detektory.^{24,25,27,28}

3.2.3.2 Systémy s normálními fázemi

U separace na normálních fázích jsou používány polární stacionární fáze a mobilní fáze mají nižší polaritu než stacionární fáze. Retenční mechanismus je založen na principu soutěže molekul analytu s molekulami mobilní fáze o adsorpční místa na povrchu stacionární fáze (např. volné hydroxylové skupiny silikagelu). Retence je dána specifickými molekulárními interakcemi mezi analytem a povrchem sorbentu a zároveň závisí také na nespecifických interakcích mezi analytem a mobilní fází. Obecně platí, že čím více jsou molekuly vzorku polární, tím se zvyšuje jejich retence. Naopak retence se snižuje s rostoucí polaritou mobilní fáze.

Důležitou roli při separaci hraje dostupnost povrchových absorpčních center stacionární fáze pro interagující funkční skupiny molekul vzorku. Zároveň také záleží na geometrickém rozložení těchto funkčních skupin v molekule vzorku. Interakce vznikají na základě vodíkových můstků nebo mají elektrostatickou povahu. Rozdíl bude také v retenci isomerů jedné látky. Objemné funkční skupiny, které stíní polárním skupinám v molekule, budou způsobovat snížení retence.

Nejčastěji se využívají stacionární fáze na bázi silikagelu, buď čistý silikagel nebo polární chemicky vázané fáze na silikagelovém nosiči. Jako mobilní fáze jsou obvykle používány binární směsi rozpouštědel s odlišnou polaritou. Polarita mobilní fáze má velký vliv na retenci, limitujícím faktorem je obsah vody. S rostoucím množstvím vody klesá reaktivita sorbentu, protože molekuly vody obsadí nejaktivnější místa na povrchu mobilní fáze. Tím se snižují retenční objemy analytů a je také zhoršena selektivita dělení.

Nevýhodou je práce v nevodném prostředí s těkavými organickými rozpouštědly, proto tento typ HPLC pomalu ustupuje. Své uplatnění má však stále při separaci analytů,

kteře se v jiných systémech rozkládají. Dále se tato metoda používá při separaci isomerů (tokoferoly, retinoly).^{16,18}

3.2.3.3 Systémy s reverzními fázemi

HPLC systém s reverzními fázemi má mobilní fáze polárního charakteru, zpravidla se jedná o směs vodné složky (voda, zředěné roztoky kyselin nebo bází) s polárními organickými rozpouštědly, které jsou mísitelné s vodou. Povrch stacionárních fází je nepolární, obvykle tvoří dlouhé uhlíkaté řetězce navázané a na povrch nosiče (silikagelu, kovových oxidů). Při separaci se především vyskytují jen slabé dispersí síly (tj. nespecifické interakce analyt-sorbent) nebo van der Waalsovy síly.

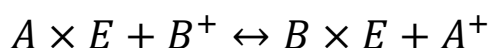
Retence závisí na více faktorech a vlastnostech analytu. Se zvyšujícím se počtem a délkou alkylů v homologických řadách roste retence zkoumaných látek, dále roste v přítomnosti více aromatických jader nebo objemných substituentů. Výskyt polárních skupin, silně polární a iontové analyty jsou na fázích zadržovány jen velmi slabě nebo vůbec. Změnou pH mobilní fáze lze snadno ovlivnit chování látek iontové povahy. Při změně pH dochází k potlačení disociace slabých kyselin či slabých zásad a díky tomu se retence analytů zvýší.

Reverzní HPLC je nejrozšířenější používaná metoda v kapalinové chromatografii. Při vývoji a optimalizaci podmínek pro novou HPLC metodu bývá zpravidla metodou první volby. Příčinou rozsáhlého uplatnění je její univerzálnost a schopnost separovat jednoduché směsi látek až po komplikované směsi jaké jsou například biologické vzorky a také látky podobné chemické struktury.^{16,18,20,22}

3.2.3.4 Iontově výměnná chromatografie

Iontově výměnná chromatografie je založena na elektrostatických přitažlivých silách, které vznikají mezi ionizovanými funkčními skupinami stacionární fáze (iontoměniče) a opačně nabitými ionty v okolním roztoku. Nazýváme ji také jako chromatografie na iontoměničích.

Výměnu iontů lze popsat rovnicí iontové výměny:



Selektivitu dělených látek k iontoměničce popisuje rovnovážná konstanta:

$$K = \frac{[A^+][BE]}{[AE][B^+]}$$

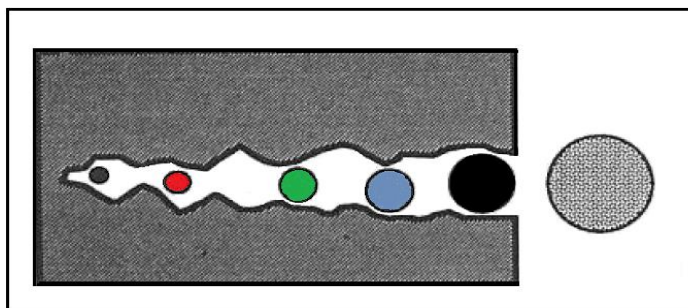
Afinita iontů k iontoměničce je ovlivněna koeficientem K, stoupá s rostoucím nábojem a objemem iontů. Retence a selektivita je významně závislá na pH a iontové síle mobilní fáze.

Existují tři strukturně rozdílné stacionární fáze: povrchově porézní – vrstva měniče je nanášena na pórovitý nosič, mikroparticulární s organickou maticí (ionexy) a chemicky vázané iontoměniče na silikagelu. Podle výměnné funkční skupiny lze ionexy rozdělit do dvou skupin na anexy a katexy. Anexy jsou nerozpustné polymerní polyvalentní baze, které uvolňují a vyměňují anionty. Katexy jsou nerozpustné polyvalentní kyseliny, které uvolňují a vyměňují kationty.

Metodou IEC lze stanovovat přítomnost kationtů a aniontů ve vodě. Dále se využívá při separaci aminokyselin, nukleonových kyselin a peptidů.^{16,18,20,22}

3.2.3.5 Molekulová vylučovací chromatografie

Principem molekulové vylučovací chromatografie neboli gelové chromatografie je dynamická separace analytů dle jejich velikosti (přesněji hydrodynamického objemu). Základní mechanismus je pojmenován jako síťový efekt. Jedná se o rozdílné pronikání molekul analytu do pórů gelu dle jejich fyzikálně-chemických vlastností (struktury). Velké molekuly se sterickým omezením nebudou pronikat do pórů gelu, naopak malé molekuly ano (obrázek č. 5). V jaké míře malé částice pronikají, záleží na jejich velikosti a rozměrech dostupných pórů gelu. Větší molekuly jsou eluovány dříve a malé molekuly později.



Obrázek č. 7: Permeace molekul různé velikosti do pórů gelu.¹⁹

Požadavky na vlastnosti gelů jsou velice náročné. Matrice gelu musí být inertní k analytům i mobilní fázi. Důležitá je také použitelnost gelu v široké oblasti pH a za zvýšené teploty. Dalším požadavkem je mechanická stabilita gelu vůči vyššímu tlaku a nerozpustnost v mobilní fázi. Gely lze rozdělit do dvou skupin, a to na xerogely (organické gely) a aerogely (anorganické gely). Každý gel má svůj parametr použitelnosti podle velikosti jeho pórů, tzv. vylučovací mez. Tento parametr udává nejmenší relativní molekulovou hmotnost molekul, které už do pórů gelu neprojdou.

Nejčastěji používané stacionární fáze jsou gely na bázi methakrylátů, akrylamidů, agarosové gely, dextranové gely a kopolymery styrenu a divinylbenzenu.

Mezi hlavní nevýhody a limitace gelové chromatografie patří nízká selektivita separace, dlouhá doba analýzy a malá objemová i hmotnostní kapacita. Aplikace metody SEC se nejvíce využívá při stanovení molekulové hmotnosti a distribuci velikosti molekul polymerů, zejména v biochemii proteinů.^{16,18,19,22}

3.2.4 Stacionární fáze

Stacionární fáze je nepohyblivá složka HPLC systému, která je ukotvena v chromatografické koloně. Jedná se o jediné zařízení, na kterém dochází k separačnímu procesu. Stacionární fáze může být tuhá látka nebo film kapaliny chemicky vázaný na tuhou matici. Rozdělení stacionárních fází je možno z mnoha pohledů. Dle polarity lze rozdělit stacionární fáze na polární, nepolární a amfoterní (zwitterionty). Dalším členěním je podle chromatografického typu separace na: NP-HPLC, RP-HPLC, IEC, fáze pro SEC, afinitní, chirální, atd. Nejpřesnější rozdělení stacionárních fází je na základě jejich chemického složení. Takto lze členit stacionární fáze na: anorganické oxidy (silikagel, oxid zirkoničitý, hlinitý, titaničitý), chemicky vázané fáze na bázi silikagelu, polymerní, hybridní a stacionární fáze na bázi grafitového uhlíku.

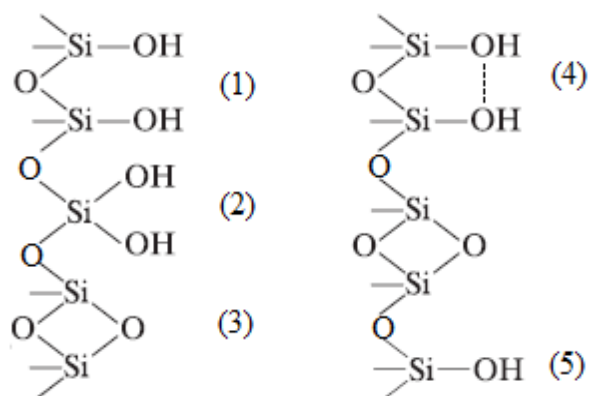
Důležité jsou obecné požadavky na stacionární fáze, které zahrnují chemickou a tepelnou stabilitu. Nemělo by docházet k reakci s mobilní fází a stacionární fáze se v ní nesmí rozpouštět.

Specifické parametry částicových stacionárních fází jsou nedílnou součástí úspěšné analýzy. Tyto parametry popisující vlastnosti částic jsou: průměrná velikost částic d_p [μm] a distribuce velikosti částic, tvar částic (pravidelné a nepravidelné), měrný objem pórů (*pore volume*) [cm^3/g] a relativní objem pórů [obj. %], měrný (specifický) povrch (*surface area*) [m^2/g], průměrná hodnota velikosti pórů (*pore size*) [nm].^{16,18}

3.2.4.1 Silikagel

Silikagel (SiO_2) je nejpoužívanější materiál pevných stacionárních fází v HPLC. Jeho vlastnosti z něj činí nejuniverzálnější nosič pro chromatografickou separaci. Silikagel poskytuje velký povrch nezbytný k úspěšné separaci a zároveň má vysokou mechanickou odolnost. Nerozpouští se ani neobtná v přítomnosti organických rozpouštědel. Avšak jeho hlavní nevýhodou je rozpustnost ve vodě při vysokém pH a extrémní polarita jeho povrchu.

Na povrchu silikagelu jsou nestejně rozmístěné silanolové skupiny, které jsou aktivními centry. Je možno popsat několik typů těchto skupin, které se liší svojí kyselostí (obrázek č. 8). Silanolové skupiny mohou být buď izolované, vicinální, geminální nebo vzájemně vázané vodíkovými vazbami. Rozmístění silanolových skupin závisí na způsobu zpracování silikagelu. Hustota rozmístění a typ silanolových skupin je nejvýznamnější parametr definující reaktivitu a polaritu povrchu silikagelu.



Obrázek č. 8: Silanové skupiny na povrchu silikagelu. (1) vicinální silanolové skupiny, (2) geminální silanolové skupiny, (3) siloxanové skupiny, (4) asociované silanolové skupiny, (5) izolovaná silanolová skupina.¹⁸

Povrch silikagelu je slabě kyselý díky silanolovým skupinám. U mobilní fáze s obsahem pufru může docházet k iontové výměně. Velmi záleží na pH mobilní fáze, zda dojde k výměně protonů silanolových skupin za kationty pufru. Pro silikagel je typické, že zadržuje více látky bazické než látky neutrální a kyselé.

Silikagel může také způsobovat chvostování píků u bazických látek. Je možné tomuto jevu zabránit přidáním slabé organické baze do mobilní fáze. Je však nutno vždy kontrolovat pH, aby nepřesáhlo hodnotu 8. Při této hodnotě by došlo k rozpuštění silikagelu.^{16,18,22}

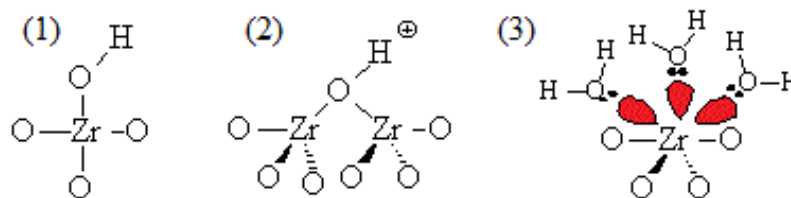
3.2.4.2 Stacionární fáze na bázi kovových oxidů

Zavedení kovových oxidů do HPLC separace bylo zapříčiněno jejich lepší chemickou stabilitou a větším teplotním rozsahem než měl doposud silikagel. V HPLC analýze se uplatnily tři typy: oxid zirkoničitý, oxid hlinitý a oxid titaničitý.

Oxid zirkoničitý

Oxid zirkoničitý přináší do chromatografie vysokou chemickou (pH 1 – 14), tepelnou (až do 200 °C) a mechanickou stabilitu. Jedná se o amfoterní měnič, který je vhodný jak pro kationty, tak pro anionty. Na jeho povrchu se nachází hydroxylové skupiny a navíc zde můžeme nalézt absorpční centra charakteru Lewisových kyselin (obrázek č. 9). Nemodifikovaný oxid zirkoničitý lze použít pro separaci na normálních fázích. Častěji se však používá modifikovaný oxid zirkoničitý. Jeho povrch může být potažen vrstvou polybutadienu (PBD), polystyrenu (PS) nebo pyrolyticky vyloučeného

uhlíku, který lze dále modifikovat ligandem C₁₈. Tyto modifikované zirkoniové stacionární fáze našli uplatnění při separaci v reverzním a HILIC systému.



Obrázek č. 9: Hlavní druhy skupin přítomné na povrchu zirkoniové stacionární fáze.

(1) Brønstedova kyselina, (2) Brønstedova báze, (3) Lewisova kyselina.³⁴

Způsob retence lze popsat kombinací mechanismu iontové a ligandové výměny a pokud se nachází i hydrofobní vrstva, tak i hydrofobními interakcemi. Typ interakce na povrchu stacionární fáze bude záviset na vlastnosti vzorku, pH mobilní fáze, typu pufru a celkové iontové síle.^{18,30,31,33,35}

3.2.5 Detekční zařízení

Funkce detektorů v HPLC je zaznamenávání rozdílu signálu mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze s analytem. Volba detektoru často závisí na chemických vlastnostech analytu a také ovlivňuje výběr mobilní fáze v chromatografickém systému. Pro ideální detektor by měly platit tyto vlastnosti: vysoká citlivost, univerzálnost, dobrá stabilita a reprodukovatelnost, rychlá odezva a rychlý sběr dat, široký lineární dynamický rozsah, spolehlivost a snadnost použití, odolnost ke změnám teploty, tlaku a mobilní fáze, specifická a nemožnost destrukce rozpouštědly. Bohužel žádný detektor nemá všechny tyto ideální vlastnosti, obtížné je především spojení univerzálnosti a specifické použitelnosti. V dnešní době mezi tři nejvyužívanější systémy patří hmotnostní, UV-VIS a fluorescenční detekce.^{18,20,36}

3.2.5.1 Spektrofotometrické detektory

HPLC spektrofotometrické detektory jsou v podstatě UV-VIS spektrofotometry vybavené průtokovou celou. Princip fungování je založen na absorpci záření ve vlnových délkách 190 až 800 nm. Absorbance se kvantitativně vyhodnocuje na základě Lambert-Beerova zákona. Následující rovnice tohoto zákona vyjadřuje vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy l , koncentrací absorbující složky c a absorbance A :

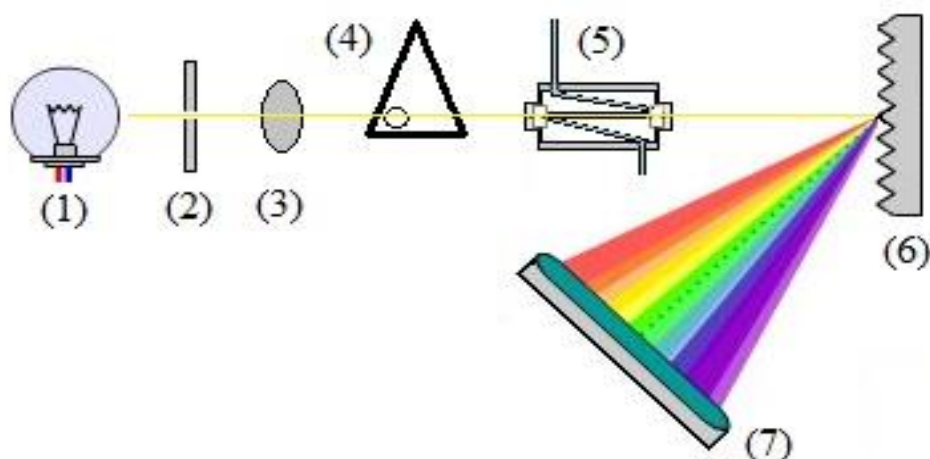
$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

ε představuje molární absorpční koeficient [l/mol/cm], který je charakteristický pro každou látku. Absorbanci lze také vyjádřit jako logaritmus poměru intenzit dopadajícího světla I_0 a odraženého světla I .

Platnost Lambert-Beerova zákona je omezena pravými a zdánlivými odchylkami, protože zákon nezahrnuje vliv rozpouštědla, vlnové délky a teploty. Pravé odchylky jsou důsledkem změny chemické rovnováhy v roztoku na základě měnící se koncentrace (iontová nebo molekulová interakce, disociace, asociace, dimerace či polymerace, tvorba komplexů a hydrolýza), zdánlivé odchylky mají fyzikální charakter, především jako důsledek nedostačující monochromatické záření.

Správně navržený UV detektor není ovlivněn teplotou ani změnou mobilní fáze. Výhodou je také vysoká citlivost a selektivita. Minimální koncentrace analytu pro detekci je možná řádově v nanogramech [hmotnost/ml].

Na základě konstrukčního uspořádání lze spektrofotometrické detektory rozdělit na čtyři skupiny: detektory s fixní vlnovou délkou, detektory s měnitelnou vlnovou délkou, detektory s programovatelnou vlnovou délkou a detektory s diodovým polem. Detektory s fixní vlnovou délkou jsou navrženy pro měření vlnové délky 254 nm. Tato vlnová délka odpovídá nízkotlaké rtuťové výbojce, která je použita jako zdroj záření. Detektory s programovatelnou vlnovou délkou lze nastavit v rozmezí 190 a 720 nm. Vlnovou délku je možno měnit během analýzy. Detektory s diodovým polem (*photodiode-array* – PDA, *diode-array detector* – DAD) mají schopnost snímat celý rozsah spektra v reálném čase bez přerušení separace. Záření vedené ze zdroje, které se zeslabí absorpcí v cele detektoru, dopadá na holografickou mřížku, která ho spektrálně rozdělí tak, že na každou z fotodiod dopadá zářivý tok o určité vlnové délce (obrázek č. 10).



Obrázek č. 10: Schéma detektoru s diodovým polem. (1) deuterinová výbojka, (2) štěrbinu, (3) čočka, (4) clona, (5) průtoková Z-cela detektoru, (6) konkávní holografická mřížka, (7) diodové pole.¹⁸

Jednotlivá fotodioda je spojena s předem nabitým kondenzátorem. Na diodu dopadá záření a vznikající fotoelektrický proud pak vybíjí kondenzátor, úměrně k intenzitě dopadajícího záření. Následuje měření proudu, který je potřebný na zpětné dobití kondenzátorů. Tento jev vybíjení a nabíjení se odehrává v rychlých sekvencích (řádově milisekundy). Při každé vlnové délce v každém okamžiku se postupně zaznamenávají údaje o absorbanci. Podle počtu diod (512 - 1024) je dáno spektrální rozlišení.

DAD detektory jsou schopné detekovat látku při jakékoliv vlnové délce. Při spolupráci s řídicí jednotkou je možné porovnávat snímaná spektra s knihovnou spekter. Další výhodou detektorů je schopnost vyhodnotit, zda se v píku eluuje jedna látka nebo směs nerozdělených analytů. Jsou vhodné i pro použití při gradientové eluci.^{18,20,36,37}

3.2.5.2 Fluorescenční detektory

Fluorescenční detektory měří sekundární (emisní) záření, které látka vyzařuje po absorpci primárního (excitačního) elektromagnetického záření. Díky absorpci elektromagnetického záření přecházejí molekuly látky ze základního vibračního stavu do excitovaného stavu. Látka se poté při přechodu do stabilnějšího stavu o nižší energii zbavuje absorbované energie formou fluorescence (lze i jiným způsobem např. přeměnou na vibrační energii, předáním energie jiné látce). Vlnová délka emitovaného záření bývá nejčastěji větší než u excitačního. Účinnost fluorescence se zmenšuje se stoupající teplotou a je závislá na koncentraci a pH mobilní fáze. Jedná se o velmi selektivní a citlivou detekci, řádově v pikogramech [hmotnost/ml].

Jednoduché fluorescenční detektory používají jako zdroj excitačního záření rtuťovou výbojku s interferenčním filtrem a detekují fluorescenční záření současně při všech vlnových délkách. U modernějších detektorů je možné nastavit vlnovou délku excitačního i emitovaného záření použitím monochromátoru. Zároveň lze programovat vlnové délky v průběhu analýzy pro každou látku zvlášť.

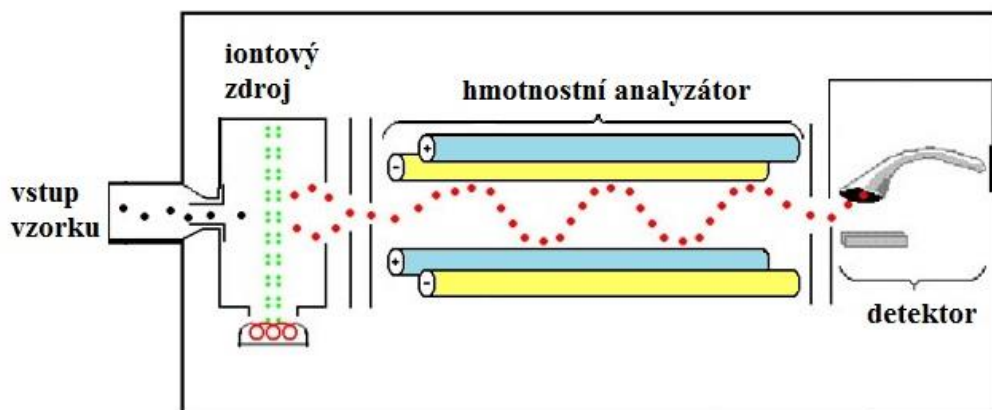
Fluorescenční detektory nacházejí uplatnění při analýzách biologických vzorků, léčiv (tetracykliny, steroidní hormony, vitamíny B₁, B₂, E, a K), potravin, fosilních paliv a při testování v rámci životního prostředí. Další uplatnění nachází fluorescenční metoda v mikrokolonové chromatografii díky možnosti miniaturizovat průtokové cely až na objem 1 nl.^{18,20,36,37}

3.2.5.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je všestranná, rychlá a citlivá analytická metoda, využívaná ke kvalitativní i kvantitativní analýze. Poskytuje velké množství informací o identitě látek.

Princip metody je rozdělení iontů látky na základě poměru hmotnosti a náboje (m/z). V prvním kroku je vzorek ionizován za vzniku iontů nebo iontových fragmentů základní látky. Následně jsou ionty rozděleny dle hodnoty poměru m/z a urychleny

v analyzátoru. Nakonec se ionty detekují a určí se relativní intenzita jednotlivých iontů. Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních částí: iontový zdroj - převedení neutrálních molekul na nabitě částice (ionizace), hmotnostní analyzátor - rozdělení iontů za vysokého vakua, detektor – detekce iontů (obrázek č. 11).



Obrázek č. 11: Obvyklé schéma hmotnostního spektrometru.³⁸

Způsob ionizace látky se volí v závislosti na těkavosti, tepelné stabilitě, molekulové hmotnosti a polaritě látky. Existují dvě skupiny technik tvrdé a měkké ionizační techniky. Elektronová (EI) ionizace je označována jako tvrdá ionizační technika. Elektronovou ionizací dochází k rozsáhlé fragmentaci, je uvolněn valenční elektron a vzniká molekulární iont $M^{+•}$. Pro EI existují knihovny spekter pro porovnání a k usnadnění identifikace látek. Limitující je použití jen pro těkavé látky. Mezi měkké ionizační techniky lze zařadit: ionizaci elektrosprejem (ESI), chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizaci za atmosférického tlaku (APPI). Při ionizaci měkkou technikou nedochází k takovému rozsahu fragmentace jako u tvrdé ionizační techniky. Těmito měkkými technikami vznikají protonované molekuly $[M+H]^+$ nebo deprotonované molekuly $[M-H]^-$. Spektra se mohou velmi lišit v souladu s pracovními podmínkami a typem přístroje. Za výhodu lze považovat lepší určení M_r ze spekter vytvořených měkkou ionizační technikou. Nevýhodou je, že nemůžeme nalézt porovnání s knihovnou spekter, protože tyto knihovny pro HPLC/MS neexistují.

Funkcí hmotnostních analyzátorů je separace iontů probíhající za vysokého vakua dle poměru m/z a jejich následné urychlení. Je možno popsat čtyři fyzikální principy separace iontů: zakřivení dráhy iontů v magnetickém nebo elektrickém poli, různá

stabilita oscilací analyzovaných iontů v kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí (kvadrupól nebo iontová past), různá délka rychlosti letu iontů (TOF - analyzátor doby letu), iontová cyklotronová rezonance - ICR.

Významným trendem dnešní doby je možnost vytvoření tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS). Tandemová hmotnostní spektrometrie je spojení dvou hmotnostních analyzátorů v čase nebo prostoru. Využívá se k identifikaci látek z komplexních směsí. Důležitá je zejména u měkkých ionizačních technik, které nepřinášejí dostatečnou strukturní informaci o vzorku. MS detekce je jediná technika, která je schopna provést potvrzení identity analytu na základě molekulové hmotnosti a strukturně specifických fragmentů. LC-MS je klíčové spojení pro identifikaci neznámých látek, nečistot a degradačních produktů.^{18,36,37}

3.2.6 Základní teoretické aspekty HPLC

Výsledkem HPLC separace je chromatogram. Chromatogram znázorňuje eluční křivky Gaussovského tvaru (píky). Vyhodnocením základních parametrů píku lze dosáhnout jak kvalitativní analýzu, tak i kvantitativní analýzu.^{16,17,18}

Mezi základní charakteristické veličiny chromatografického systému můžeme zařadit retenční charakteristiky, účinnost chromatografické kolony, selektivitu a rozlišení.^{16,18,22,39}

Retenční charakteristiky

Retenční čas (eluční čas) t_R a retenční objem (eluční objem) V_R jsou základními veličinami pro každý separovaný analyt. Vzdálenost od nástřiku vzorku k vrcholu píku vyjádřena v čase je označována jako t_R . Za tuto dobu proteče kolonou určitý objem mobilní fáze, který vyjádříme jako V_R . Retenční čas analytu je závislý na průtoku mobilní fáze, čím je průtok rychlejší, tím bude retenční čas menší. Mrtvý retenční čas t_0 je čas látky, která se nezadržuje v systému. I když látka neinteraguje se stacionární fází, její retenční čas se neobjeví ihned po nástřiku. HPLC kolona se skládá s malých částic materiálu s póry. Tyto póry mají určitý objem V_0 (mrtvý retenční objem), kterým musí neinteragující analyt projít, než vstoupí do detektoru. Další charakteristickou veličinou pro analyt je redukovaný retenční čas t'_R . Představuje dobu, kterou separovaný vzorek stráví ve stacionární fázi. Platí pro něj vzorec:

$$t'_R = t_R - t_0$$

t_R – retenční čas, t_0 – mrtvý retenční čas, t'_R – redukovaný retenční čas

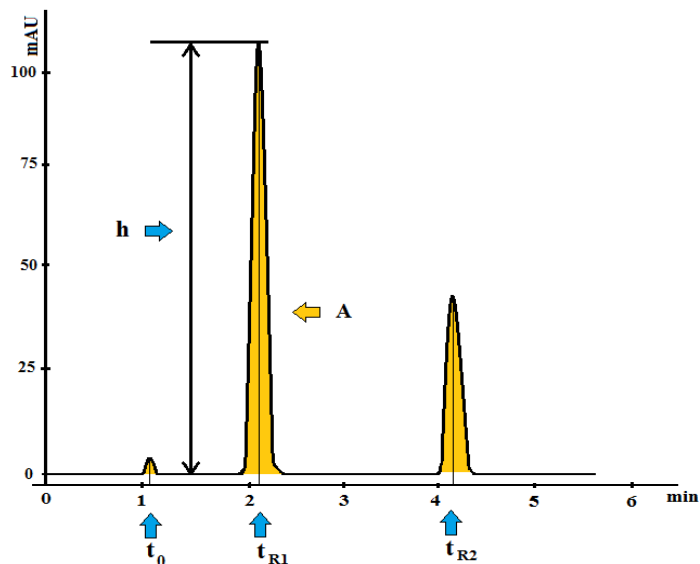
Bezrozměrná veličina, které je mírou retence konkrétní sloučeniny na konkrétním chromatografickém systému, je nazývána retenční faktor k .

Retenční faktor k lze vyjádřit rovnicí:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{V_R - V_0}{V_0}$$

t_R - retenční čas, V_R – retenční objem, t_0 – mrtvý retenční čas, V_0 – mrtvý retenční objem

Retenční čas představuje kvalitativní hodnocení pro chromatografickou separaci. Plocha pod píkem a výška píku jsou veličinou pro kvantitativní analýzu (obrázek č. 12).^{16,18,22,39}



Obrázek č. 12: Kvalitativní a kvantitativní hodnocení chromatografické separace. t_R – retenční časy, t_0 – mrtvý retenční čas, A – plocha píku, h – výška píku.¹⁸

Účinnost chromatografické kolony

Účinnost kolony je ukazatel kvality chromatografické separace. Jedná se o bezrozměrnou veličinu N , která charakterizuje stupeň disperze elučních zón. Veličina N se vyjadřuje jako počet teoretických pater:

$$N = 5,54 \left(\frac{V_R}{w_{50}} \right)^2$$

w_{50} - šířka píku v 50% jeho výšky, V_R – retenční objem

Čím je vyšší počet teoretických pater, tím méně je rozšířena eluční zóna vzorku, a tím je kolona účinnější.

Pro porovnání kolon s různou délkou se počítá s výškovým ekvivalentem teoretického patra H . Výškový ekvivalent se udává v μm a představuje délku kolony připadající na jedno patro.^{16,18,39}

$$H = \frac{L}{N}$$

N – počet teoretických pater, L – délka kolony

Selektivita

Selektivita α označuje schopnost chromatografického systému rozlišit dva rozdílné analyty. Je udávána jako poměr redukovaných retenčních časů dvou separovaných látek:

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{k_2}{k_1}$$

t'_{R1}, t'_{R2} – redukované retenční časy, k_1, k_2 - retenční faktory^{16,18}

Rozlišení

Rozlišení R je míra separace dvou látek do dvou rozdělených píků, která kombinuje dva parametry chromatografické analýzy, míru rozšiřování elučních zón a selektivitu. Rovnice, která zohledňuje veškeré parametry ovlivňující rozlišení dvou sousedních píků $R_{1,2}$, vypadá následovně:

$$R_{1,2} = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k}{1 + k} \right)$$

N – počet teoretických pater, α – selektivita, k – retenční faktor

Z rovnice vyplívá, blíží-li se selektivita k hodnotě 1, nelze prakticky dvě látky v systému rozdělit. Větší hodnota R značí lepší rozdělení píků, v praxi je však důležité dosáhnout při analýze potřebného rozlišení pro následnou reprodukci výsledků.^{16,18}

Asymetrie píku

Hlavní snahou analýzy je vytvoření ideálních píků (dokonale oddělené, úzké a symetrické) v přijatelném čase. Kvalita chromatografické separace se mimo jiné odráží také v asymetrii píku. Asymetrii píku lze vyjádřit jako faktor chvostování (tailing factor) T_f nebo se používá faktor asymetrie A (obrázek č. 13). Faktor chvostování vypočítáme jako šířka píku v 5% výšky ($w_{0,05}$) děleno dvojnásobek šířky píku vzestupné části (f):

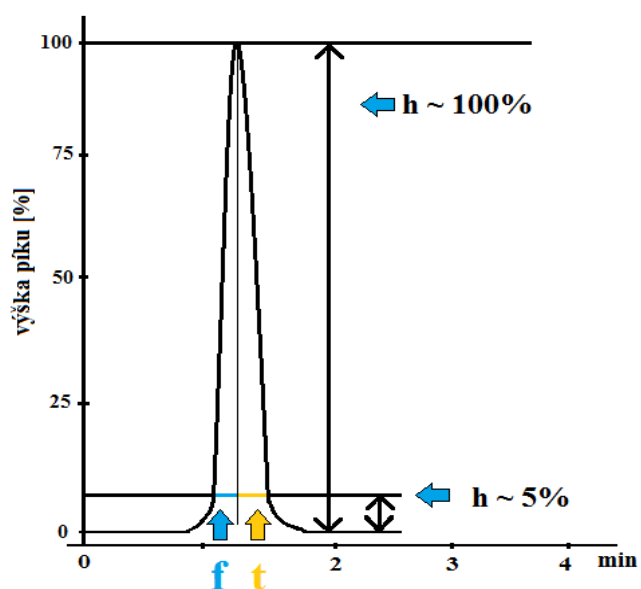
$$T_f = \frac{w_{0,05}}{2f}$$

$w_{0,05}$ – šířka píku v 50 % jeho výšky, f – šířka vzestupné části píku

Faktor asymetrie A je dán vztahem:

$$A = \frac{t}{f}$$

t - šířka sestupné části píku, f - šířka vzestupné části píku (nejčastěji v 5 % nebo 10 % výšky píku)^{16,18}



Obrázek č. 13: Schéma pro výpočet asymetrie píku.¹⁸

3.3 Chromatografické podmínky HILIC analýzy uvedené v literatuře

V tabulce č. 1 jsou uvedeny některé studie, které se zabývaly HILIC analýzou s různými typy sloučenin. Jsou popsány chromatografické podmínky a stručně obsah studie.

Předchozí studie zabývající se analýzou při HILIC podmínkách			
autoři	obsah studie	chromatografické podmínky	zdroj
P. Kalafut, R. Kučera, J. Klimeš	Hodnocení vlivu uhlíkaté vrstvy na zirkoniové koloně na analýzu polárních sloučenin HILIC metodou.	mobilní fáze: různé poměry ACN a vodné fáze; různé koncentrace kys. octové stacionární fáze: b-ZrO ₂ , Zr-PBD, Zr-C (ZirChrom; 150 mm x 4,6 mm; 5 μm) detekce: UV při 254 nm	30
R. Kučera, P. Kovaříková, M. Klivický, J. Klimeš	Retenční chování polárních sloučenin na zirkoniové koloně při HILIC podmínkách analýzy.	mobilní fáze: různé poměry ACN a vodné fáze; různé koncentrace kys. octové stacionární fáze: b-ZrO ₂ , Zr-PBD (ZirChrom; 150 mm x 4,6 mm; 5 μm); Atlantis HILIC Silica (150 mm x 2,1 mm; 3 μm) detekce: UV při 254 nm	41
T. Zhou, C. A. Lucy	Hodnocení vlivu složení mobilní fáze na separaci a retenci nukleotidů na koloně b-TiO ₂ metodou HILIC.	mobilní fáze: různé poměry ACN a fosforečnananu sodného stacionární fáze: b-TiO ₂ (ZirChrom; 150 mm x 4,6 mm; 3 μm) detekce: UV při 254 nm	42
T. Zhou, C. A. Lucy	Retenční chování karboxylových sloučenin na koloně b-TiO ₂ při HILIC podmínkách.	mobilní fáze: různé poměry ACN a vodné fáze; různé koncentrace fosforečnananu sodného stacionární fáze: b-TiO ₂ (ZirChrom; 150 mm x 4,6 mm; 3 μm) detekce: UV při 254 nm	43

Tabulka č. 1: Studie zabývající se analýzou při HILIC podmínkách.

4. Experimentální část

4.1 Přístroje, chemikálie a pomůcky

4.1.1 Chromatografický systém

- kontrolní jednotka: CTO-20AC VP Shimadzu
- čerpadlo: LC-20AD VP Shimadzu
- degaser: DGU-20A3 VP Shimadzu
- termostat kolony: CTO-20AS VP Shimadzu
- PC program: Shimadzu LC Solution
- UV-VIS detektor: SPD-20A VP Shimadzu
- autosampler: SIL-20AC VP Shimadzu
- řídicí jednotka: CBM-20A VP Shimadzu
- chromatografická kolona: ZirChrom[®]-CARB 150 × 4,6 mm, velikost částic 5 μm, ZirChrom Separation Inc, USA

4.1.2 Chemikálie

- aciklovir (ACI), Pliva Lachema, Česká republika
- guanin hydrochlorid (GUA), Pliva Lachema, Česká republika
- acetonitril (ACN), methanol (MeOH) Chromasolv gradient grade for HPLC, Sigma Aldrich, Česká republika
- kyselina trifluoroctová (TFA), octan amonný (CH₃COONH₄), Penta, Česká republika
- hydroxid sodný (NaOH), kyselina chlorovodíková (HCl), amoniak 25 % (NH₃) Dr. Kulich Pharma, Česká republika
- voda čištěná

4.1.3 Přístroje

- Digitální váhy: Sartorius AG A200S. Německo
- pH-metr: SCHOTT CG 843, Schott Instruments GmbH, Německo

- magnetické míchadlo, IKA Color Squid, Německo
- ultrazvuková lázeň K10, Kraitek, Slovensko

4.1.4 Pomůcky

- Laboratorní lžičky, navažovací lodičky, skleněné tyčinky, kádinky, odměrné válce, dělené pipety, balónek k pipetě, nedělené pipety, mikropipety, stříčky, vialky, zábrusové lahve, odměrné baňky, odsávací baňka, magnetické míchadlo, zásobníky mobilní fáze, šroubovací inserty pro vialky, alobal, membránový filtr (NY Simplepure 0,45 μ m).

4.2 Obecné postupy

4.2.1 Příprava vzorků pro analýzu

Roztok acikloviru byl připraven rozpuštěním 1mg acikloviru v 10,0 ml směsi acetonitril/voda 50:50 (v/v) v odměrné baňce. Poté bylo odebráno 5,0 ml tohoto roztoku do odměrné baňky na 10,0 ml a doplněno směsí acetonitril/voda (50:50, v/v). Výsledná koncentrace roztoku acikloviru byla 50 µg/ml.

Roztok guaninu byl připraven obdobným způsobem jako roztok acikloviru, jen před doplněním směsí rozpouštědla acetonitril/voda v prvním kroku se přidaly 3 kapky NaOH, aby došlo k úplnému rozpuštění guaninu.

Dále byl vytvořen směsný vzorek acikloviru a guaninu. Koncentrace acikloviru ve směsi byla 50 µg/ml a koncentrace guaninu byla 10 µg/ml.

Zásobní roztoky vzorků byly uchovávány v lednici.

4.2.2 Příprava roztoků

Vypočítané množství kyseliny trifluoroctové (TFA) ($M_{\text{CF}_3\text{COOH}} = 114,03 \text{ g/mol}$, $\rho = 1,5351 \text{ g/cm}^{-3}$) bylo odměřeno mikropipetou a smícháno s čištěnou vodou. Postupně byly vytvořeny roztoky tak, aby výsledná koncentrace TFA v mobilní fázi byla 10 mM, 5mM, 2,5 mM, 0,5 mM, 0,1 mM a 0,05 mM.

Vypočítané množství octanu amonného ($M_{\text{CH}_3\text{CONH}_4} = 77,0825 \text{ g/mol}$) bylo naváženo a rozpuštěno v potřebném množství. Postupně byly připraveny roztoky tak, aby výsledná koncentrace octanu amonného byla 10 mM, 25 mM a 50 mM.

4.2.3 Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze se skládala z organické složky – acetonitril (ACN), methanol (MeOH) a z vodné fáze – v příslušném poměru, viz tabulka č. 2. Některé mobilní fáze neobsahovaly přídavek methanolu a poměry ACN a vodné fáze byly následovné: 90:10; 85:15, v/v.

složení mobilních fází		
ACN	MeOH	vodná fáze
25 %	60 %	15 %
35 %	50 %	15 %
50 %	35 %	15 %
60 %	25 %	15 %
65 %	25 %	10 %
70 %	25 %	15 %
75 %	15 %	5 %
80 %	5 %	15 %

Tabulka č. 2: Složení mobilních fází s přidavkem methanolu.

Dále bylo u některých mobilních fází upraveno pH pomocí kyseliny chlorovodíkové na nižší hodnotu (pH = 1,1; pH = 1,3). Pomocí 10 % amoniaku bylo upraveno pH jedné z mobilních fází na hodnotu 9.

4.3 Optimalizace podmínek HPLC separace

4.3.1 Přednastavení HPLC chromatografu

Před samotnou analýzou bylo důležité na chromatogramu ustálit základní linii. Ustalování rovnováhy bylo nastaveno na cca 80 min. Propláchnutí chromatografu směsí acetonitril/voda (50:50, v/v) se provádělo při výměně mobilní fáze a také na konci měření.

4.3.2 Chromatografické podmínky

Pro HPLC analýzu byly chromatografické podmínky nastaveny následovně:

- Kolona: ZirChrom[®] – CARB
- Průtok: 3,0 ml/min
- Detekce: 254 nm
- Nastříkovaný objem vzorků: 20 μ l
- Teplota: 55 °C, 70 °C, 83 °C
- Mobilní fáze: organická složka : vodná složka – různé poměry, pH a koncentrace TFA a CH₃COONH₄

4.3.3 Vliv chromatografických podmínek na retenci ACI a GUA

Pro HPLC analýzu byly použity mobilní fáze v různém poměru organického rozpouštědla a vodné fáze. Vzorky acikloviru a guaninu o koncentraci 50 μ g/ml byly nastříkovány samostatně, každý vždy dvakrát. První složení mobilní fáze bylo acetonitril-vodná fáze (85 : 15, v/v). Jako vodná fáze byl pro první analýzu vybrán octan amonný. Mobilní fáze obsahovala octan amonný v molaritě 50 mM, 25mM a 10 mM. Byl sledován současně vliv změny teploty a molarity mobilní fáze na retenci acikloviru a guaninu.

Dalším krokem byla změna pH 25 mM mobilní fáze. Za použití 25 % amoniaku bylo pH upraveno na hodnotu 9 a kyselinou chlorovodíkovou bylo upraveno pH na hodnotu 3. Tato analýza probíhala při teplotě 70 °C.

Dále se pracovalo jen s teplotou 70 °C. Jako vodná fáze byla pro další měření vybrána kyselina trifluoroctová. Mobilní fáze obsahovala TFA v koncentraci 10 mM, 5 mM, 2,5 mM, 0,5 mM, 0,1 mM, 0,05 mM. Následně se zjišťoval vliv methanolu v mobilní fázi na retenci vzorků. Byla připravena mobilní fáze tvořená směsí acetonitrilu, methanolu a vodné složky s TFA. Zastoupení methanolu se pohybovalo od 5 % až do 60 %, poměr vodné fáze zůstal nezměněn (15%). Mobilní fáze s 25 % methanolem byla

zkoušena ve všech molaritách, jako předešlá mobilní fáze (10 mM, 5 mM, 2,5 mM, 0,5 mM, 0,1 mM, 0,05 mM).

Dalším krokem byla změna poměru vodné fáze vůči organické fázi. Procento vodné fáze bylo sníženo z 15 % na 10 % a 5 %. Tento postup se aplikoval na mobilní fázi o celkové koncentraci 2,5 mM TFA.

Neméně důležitým zkoumaným faktorem bylo pH mobilní fáze. Mobilní fáze s 0,5 mM TFA byla okyselena na pH 1,3 a 1,1 přidáním kyseliny chlorovodíkové. Tato mobilní fáze byla připravena v poměru acetonitril : vodná fáze (85 : 15) a s přídavkem methanolu v poměru acetonitril : methanol : vodná fáze (60 : 25 : 15).

5. Výsledky a diskuze

5.1 Vliv teploty a koncentrace octanu amonného na retenci

Byl zkoumán vliv teploty (55°C, 70°C a 83°C) na retenci acikloviru a guaninu při různých koncentracích (10mM, 25mM, 50mM) octanu amonného v mobilní fázi. Tabulka č. 3 znázorňuje retenční časy acikloviru a guaninu.

Složení mobilní fáze:

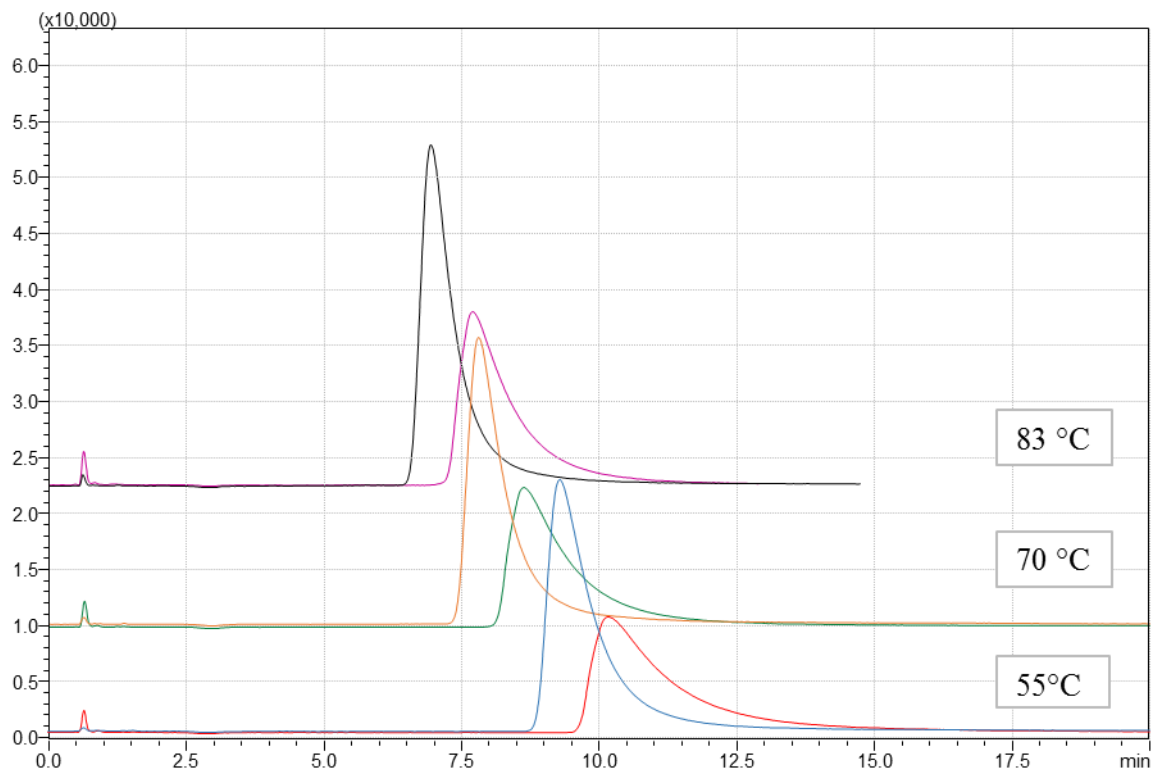
- ACN : octan amonný – 85 : 15 (v/v)
- molarita CH₃COONH₄ 10 mM (pH = 6,5), 25 mM (pH = 6,8), 50 mM (pH = 6,9)
- pH mobilní fáze 10 mM: 7,3; 25mM: 7,6; 50mM: 7,8
- teploty: 55 °C, 70 °C, 83 °C

Tabulka retenčních faktorů				
teplota	vzorky	molarita CH ₃ COONH ₄		
		10 mM	25 mM	50 mM
55 °C	ACI	16,2	13,2	13,8
	GUA	17,3	14,6	14,7
70 °C	ACI	14,1	11,6	11,9
	GUA	15,4	12,3	12,3
83 °C	ACI	12,9	10,3	10,4
	GUA	14,1	11,0	10,8

Tabulka č. 3: Retenční faktory acikloviru a guaninu při různých teplotách a molaritách CH₃COONH₄.

Komentář:

Důležitý vliv na retenční chování analytů při HILIC separaci má mimo jiné teplota kolony. U kolony ZirChrom®-CARB výrobce obecně doporučuje minimální teplotu analýzy 50 °C.⁴⁰ Z naměřených hodnot (tabulka č. 3) je patrné, že se stoupající teplotou retence klesá. Také se nepatrně zužuje eluční zóna a zlepšuje se symetrie píků (obrázek č. 15). Pokles retenčních faktorů při vyšších teplotách není tak výrazný, jako byl pozorován u studie se zirkoniovými kolonami b-ZrO₂ a Zr-PBD. Tento jev může být připisován uhlíkové vrstvě na povrchu Zr-C. Naopak při studii zaměřené na polární sloučeniny na zirkoniových kolonách při HILIC podmínkách bylo zjištěno, že retence karboxylových kyselin na koloně Zr-C při vyšších teplotách stoupá.^{30,41}



Obrázek č. 14: Retenční chování ACI a GUA při změnách teploty. ACI – modrá, oranžová, černá; GUA – červená, zelená, fialová. Mobilní fáze 85:15 (ACN : vodná fáze), molarita octanu amonného 25 mM (pH = 6,5), pH mobilní fáze = 7,6.

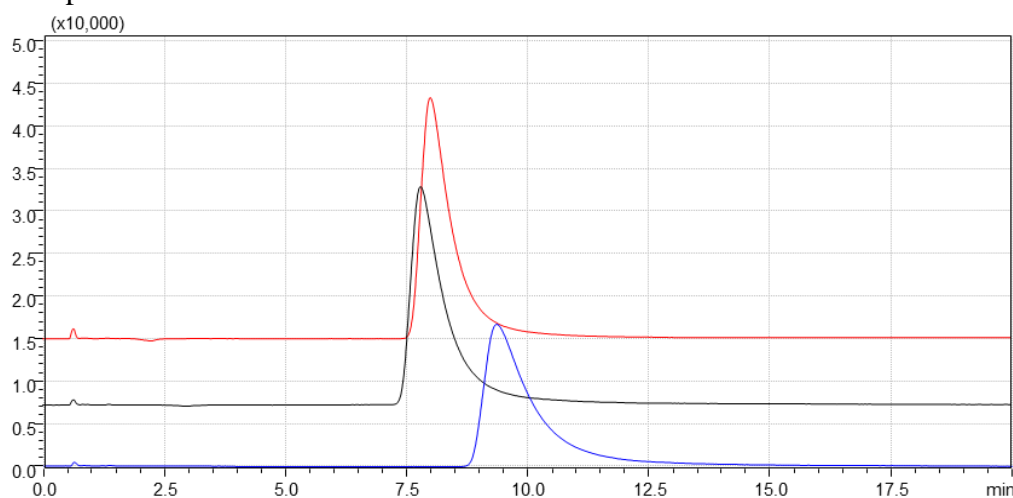
Pro další měření byla vybrána optimální teplota 70 °C. Při této hodnotě je pozorována lepší symetrie píku než u nižších teplot. I když při teplotě 83 °C byla symetrie píků nejlepší a retenční časy nejkratší, nechtěli jsme provádět separaci na hraničních možnostech přístroje. Teploty vyšší než 83 °C nebyly zkoumány vzhledem k limitu (85 °C) přístroje.

5.2 Vliv koncentrace octanu amonného

Bylo pozorováno, jak je ovlivňována retence acikloviru a guaninu při různých koncentracích octanu amonného v mobilní fázi. Molarita octanu amonného byla: 10 mM, 25 mM, 50 mM.

Složení mobilní fáze:

- ACN : octan amonný – 85 : 15 (v/v)
- molarita CH₃COONH₄: 10 mM (pH = 6,5), 25 mM (pH = 6,8), 50 mM (pH = 6,9)
- pH mobilní fáze 10 mM: 7,3; 25mM: 7,6; 50mM: 7,8
- teplota: 70°C



Obrázek č. 15: Retenční chování acikloviru v závislosti na koncentraci octanu amonného v mobilní fázi při 70°C; modrá – 10 mM, červená - 25 mM, černá - 50 mM.

Komentář:

Na chromatogramu je znázorněn vliv koncentrace octanu amonného na retenci acikloviru. Při koncentraci 10 mM je patrné prodloužení retenčního času. Pravděpodobně nedošlo k obsazení všech vazebných míst typu Lewisovy kyseliny na povrchu zirkoniové kolony. Tato místa jsou obsazována octanem amonným, který zde figuruje jako Lewisova base. Vytvořil se tak prostor pro interakci analytu s povrchem kolony, pravděpodobně se jedná o mechanismus na principu výměny ligandů.³⁰

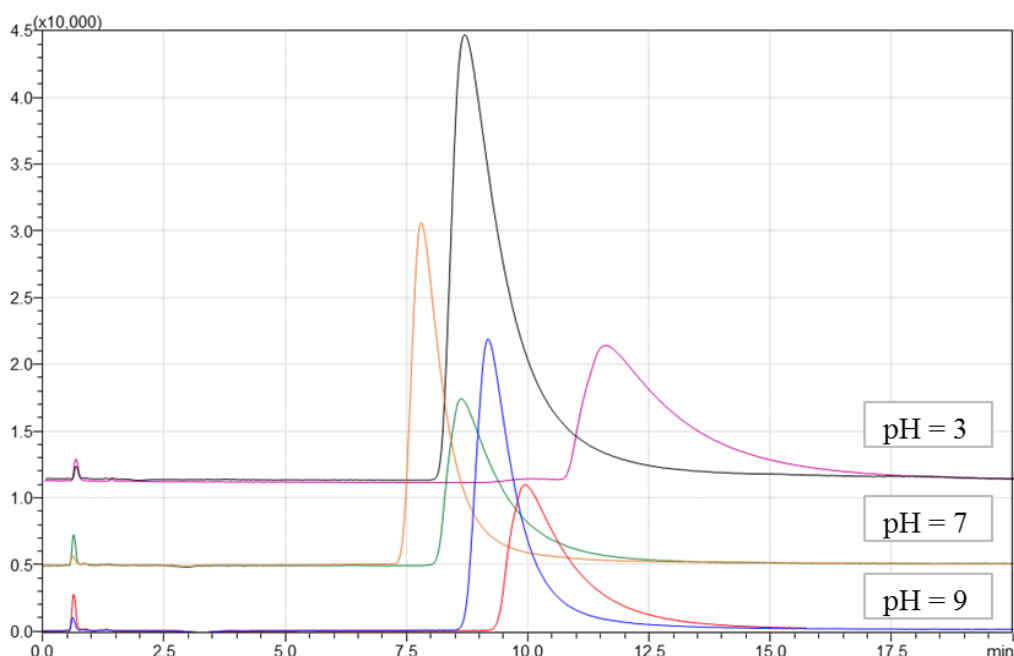
Koncentrace 25 mM a 50 mM již nevykazují značný rozdíl v retenčních časech. Důvodem tohoto jevu může být kompletní saturace vazebných míst na povrchu kolony, která neumožňovala další interakce povrchu s analytem. U těchto koncentrací je pravděpodobné, že se uhlíková vrstva podílí na separaci. Pokud by nedocházelo k interakci s uhlíkovou vrstvou, tak by se píky analytů eluovaly při mrtvém čase.

5.3 Vliv pH mobilní fáze na retenci

Porovnávání vlivu pH mobilní fáze na separaci acikloviru a guaninu při koncentraci 25 mM octanu amonného v mobilní fázi. Mobilní fáze byly upraveny na pH 3,0; 7,0 a 9,0.

Složení mobilní fáze:

- ACN : octan amonný – 85 : 15 (v/v)
- molarita CH₃COONH₄: 25 mM (pH = 6,8)
- pH mobilní fáze: 3,0; 7,0; 9,0
- teplota: 70 °C



Obrázek č. 16: Retenční chování ACI a GUA na různé pH mobilní fáze. ACI – modrá, oranžová, černá; GUA – červená, zelená, fialová.

Komentář:

Aciklovir má dvě hodnoty pKa 2,27 (kyselá enolická skupina) a 9,29 (sekundární aminoskupina). Při pH 3 – 8,5 je méně disociován, než při hodnotách pH menších než 3 a naopak větších než 9, proto se vyskytuje mechanismus separace jako na reverzních fázích. Nad pH 9 a pod pH 2 by byl aciklovir disociován a uplatnily by se iontové interakce. Podmínky pod pH 2 byly zkoumány a jsou popsány níže. Při pH 3, 7 a 9 nevykazuje aciklovir ani guanin větší rozdíly v retenci. U pH 3 dochází k rozmývání elučních zón. Obdobně se chová guanin, který má tři hodnoty pKa: 3,3; 9,2; 12,3.

5.4 Vliv molarity trifluoroctové kyseliny na retenci

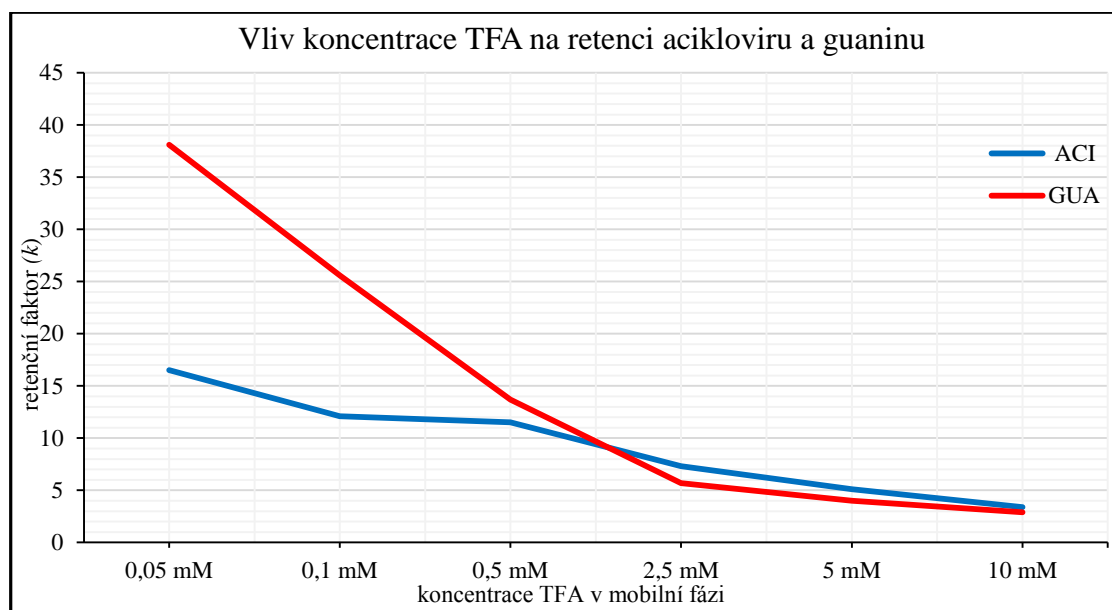
Porovnání vlivu různé molarity kyseliny trifluoroctové v mobilní fázi na retenci acikloviru a guaninu. Mobilní fáze byly použity v poměru ACN : vodná fáze (85 : 15, v/v) a mobilní fáze s přidavkem methanolu ACN : MeOH : vodná fáze (60 : 25 : 15, v/v). Celkové pH mobilní fáze a pH vodné fáze s TFA je uvedeno v tabulce č. 4.

Složení mobilní fáze:

- ACN : TFA – 85 : 15 (v/v)
- teplota: 70 °C

	koncentrace TFA v mobilní fázi					
	0,05 mM	0,1 mM	0,5 mM	2,5 mM	5 mM	10 mM
pH vodné fáze	3,1	3,1	2,3	1,8	1,4	1,1
pH mobilní fáze	3,0	2,6	2,0	1,6	1,4	1,3

Tabulka č. 4: Celkové pH mobilních fází a pH různých koncentrací trifluoroctové kyseliny v mobilní fázi (ACN : TFA - 85 : 15).



Graf č. 1: Retenční faktory acikloviru a guaninu v závislosti na měnící se molaritě TFA v mobilní fázi (ACN : TFA – 85 : 15).

Komentář:

Značný vliv na retenci má pH mobilní fáze a koncentrace TFA. Při použití kyseliny trifluoroctové v mobilní fázi došlo k urychlení analýzy. Pokud by docházelo k eluci na základě iontové výměny, při zvyšujícím se zastoupení TFA by se retence zvýšila. Proto je pravděpodobné, že na Zr-C dochází k eluci na základě výměny ligandů. Se snižující molaritou TFA se retence zvyšuje, je vytvořen prostor pro interakci analytů se stacionární fází.

Dále je možné pozorovat změnu rozlišení píků acikloviru a guaninu (graf č. 1). Při 0,1 mM TFA je rozlišení (3,8) větší než u vyšších koncentrací TFA v mobilní fázi.

Za zmínku také stojí pořadí separace acikloviru a guaninu. Při nízké koncentraci (0,05 mM – 0,5 mM) TFA je aciklovir eluován jako první. Toto pořadí je stejné při vyšších koncentracích octanu amonného (tabulka č. 3). Ale naopak při vyšších koncentracích kyseliny trifluoroctové se guanin eluuje před aciklovirem.

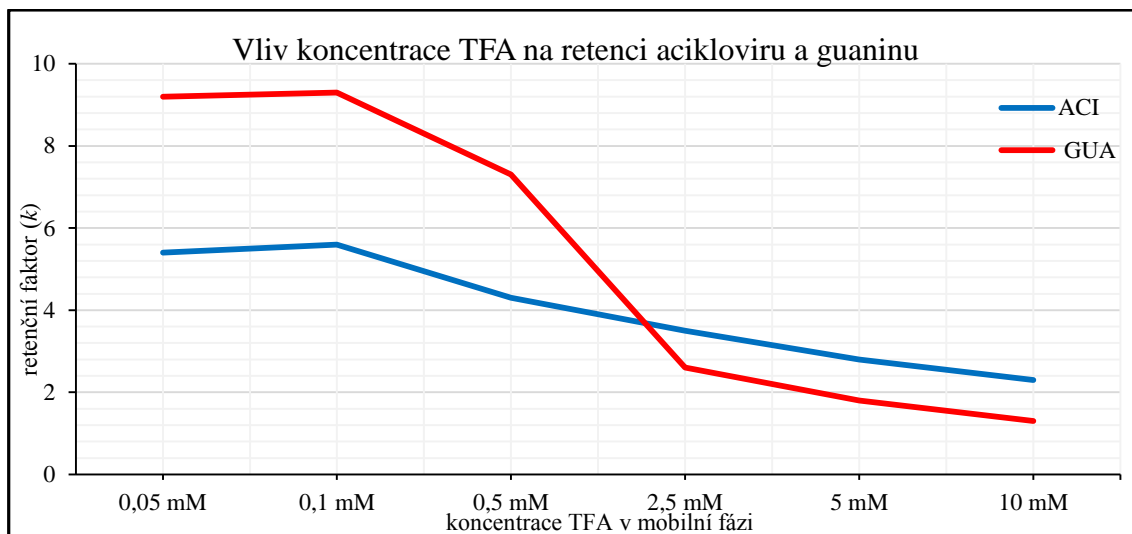
Následné měření bylo provedeno při stejném zastoupení methanolu v mobilní fázi při změně koncentrace TFA. Byl sledován vliv methanolu v mobilní fázi na retenční časy acikloviru a guaninu. Celkové pH mobilní fáze a pH vodné fáze s TFA je uvedeno v tabulce č. 5.

Složení mobilní fáze:

- ACN : MeOH : TFA – 60 : 25 : 15 (v/v)
- teplota: 70 °C

	koncentrace TFA v mobilní fázi					
	0,05 mM	0,1 mM	0,5 mM	2,5 mM	5 mM	10 mM
pH vodné fáze	3,1	3,1	2,3	1,8	1,4	1,1
pH mobilní fáze	3,1	3	2,5	1,9	1,7	1,5

Tabulka č. 5: Celkové pH mobilních fází a pH různých koncentrací trifluoroctové kyseliny v mobilní fázi (ACN : MeOH : TFA – 60 : 25 : 15).



Graf č. 2: Retenční faktory acikloviru a guaninu v závislosti na měnící se molaritě TFA v mobilní fázi (ACN : MeOH : TFA – 60 : 25 : 15).

Komentář:

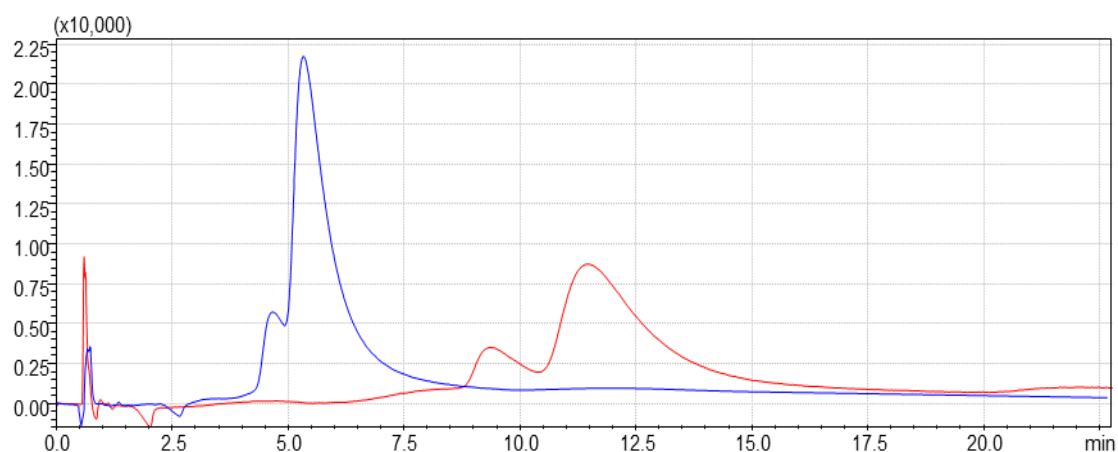
Přídavek methanolu do mobilní fáze vedl celkově ke snížení retence obou analytů. U nižších koncentrací TFA (0,05 mM a 0,1 mM) nastal až mnohonásobný pokles retence a také se výrazně snížilo rozlišení píků acikloviru a guaninu. Symetrie píků se jen nepatrně zlepšila.

5.5 Vliv změny poměru vodné a organické složky

Vliv změny poměru organické složky a vodné složky na retenci acikloviru a guaninu. Požití mobilní fáze s koncentrací TFA 2,5 mM. Nástřik roztoku vzorku se směsí acikloviru a guaninu.

Složení mobilní fáze:

- ACN : TFA – 85 : 15 (v/v); pH vodné fáze: 1,8; celkové pH mobilní fáze: 1,6
- ACN : TFA – 90 : 10 (v/v); pH vodné fáze: 1,6; celkové pH mobilní fáze: 1,3
- molarita TFA: 2,5 mM
- teplota: 70 °C



Obrázek č. 17: Vliv změny poměru vodné fáze na retenci směsi acikloviru a guaninu; červená – 90 : 10 (ACN : TFA); modrá – 85 : 15 (ACN : TFA).

Komentář:

Předchozí studie se zabývaly retencí různých sloučenin v závislosti na koncentraci acetonitrilu v mobilní fázi na kolonách Zr-PBD, b-ZrO₂ a Zr-C. Bylo prokázáno, že se závislost retence na koncentraci projevuje typickou křivkou ve tvaru písmene „U“. ^{30,41} Při mobilní fázi s vysokým obsahem ACN (81 - 95 %) se uhlíková vrstva na koloně Zr-C podílí na retenci. ³⁰ Mobilní fáze se stává více hydrofobní, zkoušené analyty preferují hydrofilnější část mobilní fáze, která se hromadí u povrchu stacionární fáze, což vede ke zvýšení retence. ⁴⁰

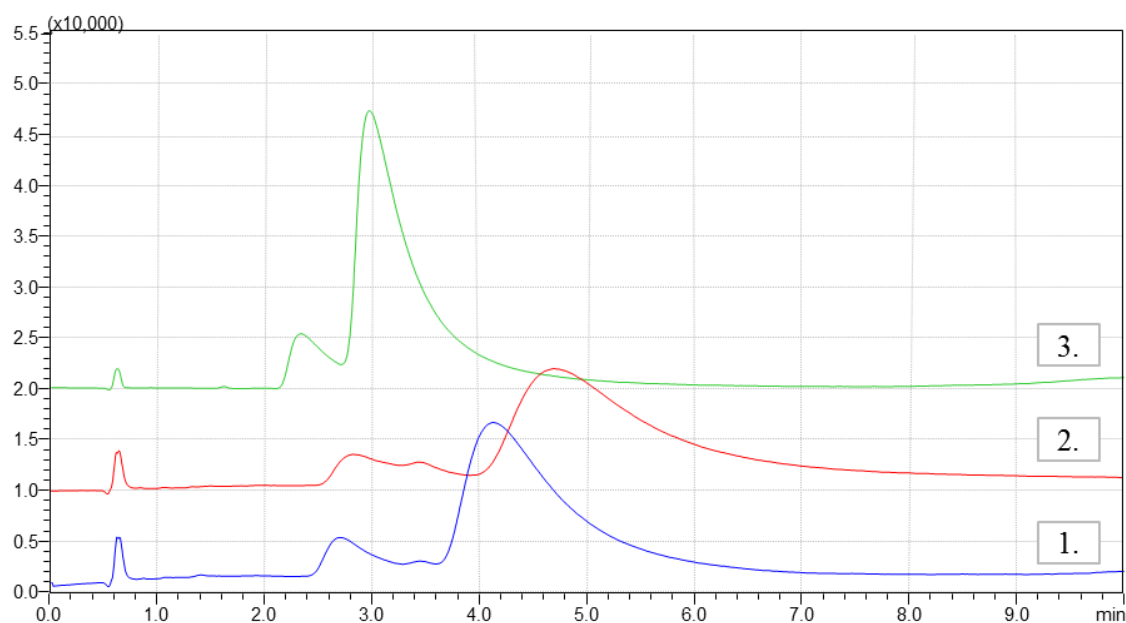
Z chromatogramu je patrné, že při zvýšení procentuálního zastoupení ACN se retence acikloviru i guaninu zvyšuje (obrázek č. 17). Ale přesně nelze určit, zda se jedná o interakci s uhlíkovou vrstvou nebo povrchem ZrO₂. ^{30,41} Další zvýšení ACN v mobilní fázi se neprovádělo z důvodu velmi nízkého pH vodné složky (asi 0,8), které by mohlo

kolonu poškodit. Při přidání MeOH do mobilní fáze bylo možné snížit zastoupení vodné složky až na 5 %.

Bylo provedeno porovnání změny retence po přidavku methanolu do mobilní fáze. Poměr methanolu zůstává stejný, mění se poměry acetonitrilu a vodné fáze.

Složení mobilní fáze:

1. ACN : MeOH : TFA – 70 : 25 : 5 (v/v); pH vodné fáze: 1,3; pH mobilní fáze: 1,8
 2. ACN : MeOH : TFA – 65 : 25 : 10 (v/v); pH vodné fáze: 1,6; pH mobilní fáze: 1,7
 3. ACN : MeOH : TFA – 60 : 25 : 15 (v/v); pH vodné fáze: 1,8; pH mobilní fáze: 1,9
- molarita TFA: 2,5 mM
 - teplota: 70 °C



Obrázek č. 18: Retenční chování vzorku směsi acikloviru a guaninu v závislosti na změně vodné fáze. (1) 5 %, (2) 10 %, (3) 15 % vodné fáze.

Komentář:

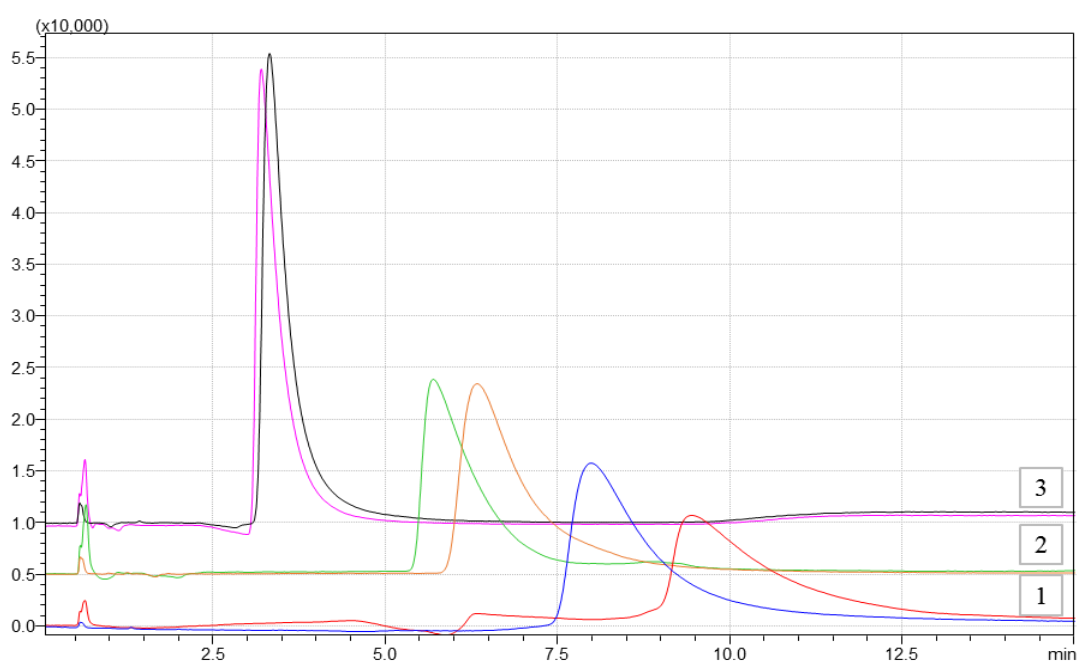
Po přidání MeOH do mobilní fáze (obrázek č. 18) se retence nepatrně snížila oproti mobilní fázi bez methanolu (obrátek č. 17). Při nižším zastoupení vodné fáze (10 % a 5 %) se rozšířily se eluční zóny a zvýšilo se chvostování píků (obrázek č. 18). Proto se v dalších analýzách pracovalo s mobilní fází obsahující 15 % vodné složky.

5.6 Vliv změny pH u 0,5 mM mobilní fáze

Pozorování vlivu pH mobilní fáze na separaci acikloviru a guaninu. Mobilní fáze byla použita v poměru ACN : vodná fáze – 85 : 15 (v/v) s 0,5 mM TFA.

Složení mobilní fáze:

- ACN : TFA – 85 : 15 (v/v); pH vodné fáze: 2,3
- pH mobilní fáze: 2,5; 1,3; 1,1
- molarita TFA: 0,5 mM
- teplota: 70 °C



Obrázek č. 19: Retenční chování ACI a GUA při změně pH mobilní fáze. ACI – modrá, oranžová, černá; GUA – červená, zelená, fialová. (1) pH = 2,5, (2) pH = 1,3, (3) pH = 1,1.

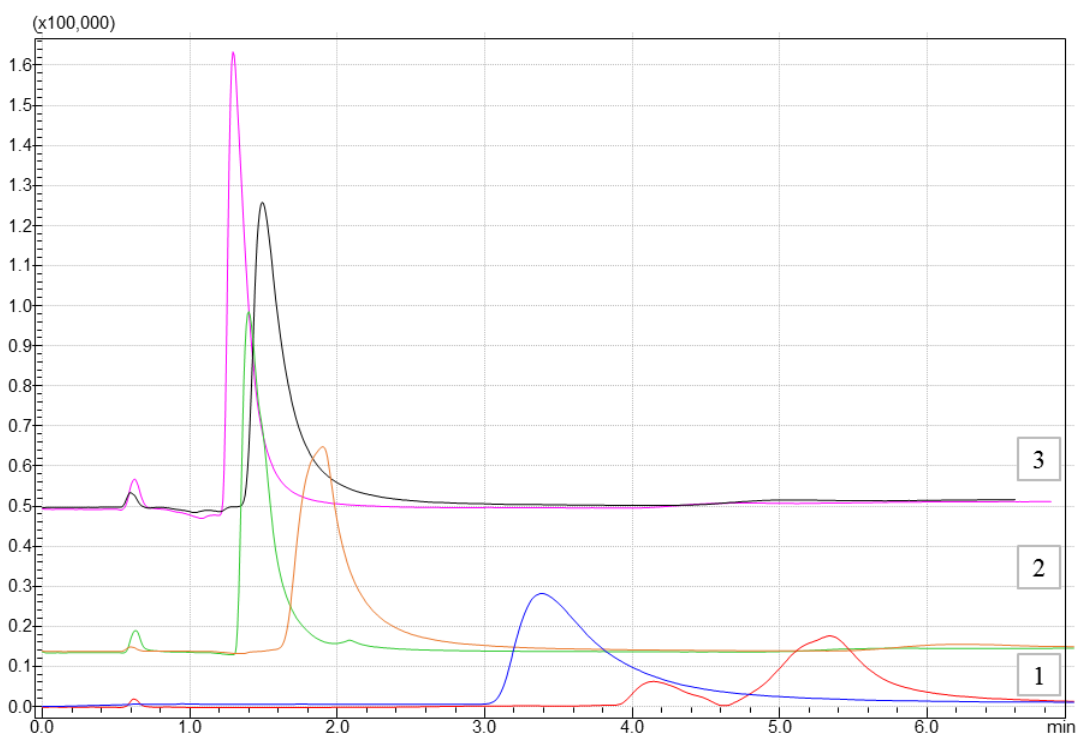
Komentář:

Na chromatogramu lze pozorovat s klesajícím pH snížení retenčních časů obou sloučenin (obrázek č. 19). Dále je zřetelné, že se snižujícím se pH se snižuje i rozlišení píků acikloviru a guaninu. Nízké pH má kladný vliv na symetrii a tvar píků. Povrch zirkoniové kolony při pH 1,1 a 1,3 vykazuje záporný náboj a interaguje s kladně nabitým aciklovirem a guaninem, dochází pravděpodobně k repulzi analytů na základě iontových interakcí.

Porovnání změny retence po přidání MeOH do mobilní fáze a následné okyselení mobilní fáze. Mobilní fáze byla použita v poměru ACN : MeOH : vodná fáze – 60 : 25 : 15 (v/v) s 0,5 mM TFA.

Složení mobilní fáze:

- ACN : MeOH : TFA – 60 : 25 : 15 (v/v); pH vodné fáze: 2,3
- pH mobilní fáze: 2,5; 1,3; 1,1
- molarita TFA: 0,5 mM
- teplota: 70 °C



Obrázek č. 20: Retenční chování ACI a GUA při změně pH mobilní fáze za přítomnosti MeOH. ACI – modrá, oranžová, černá; GUA – červená, zelená, fialová. (1) pH = 2,5, (2) pH = 1,3, (3) pH = 1,1.

Komentář:

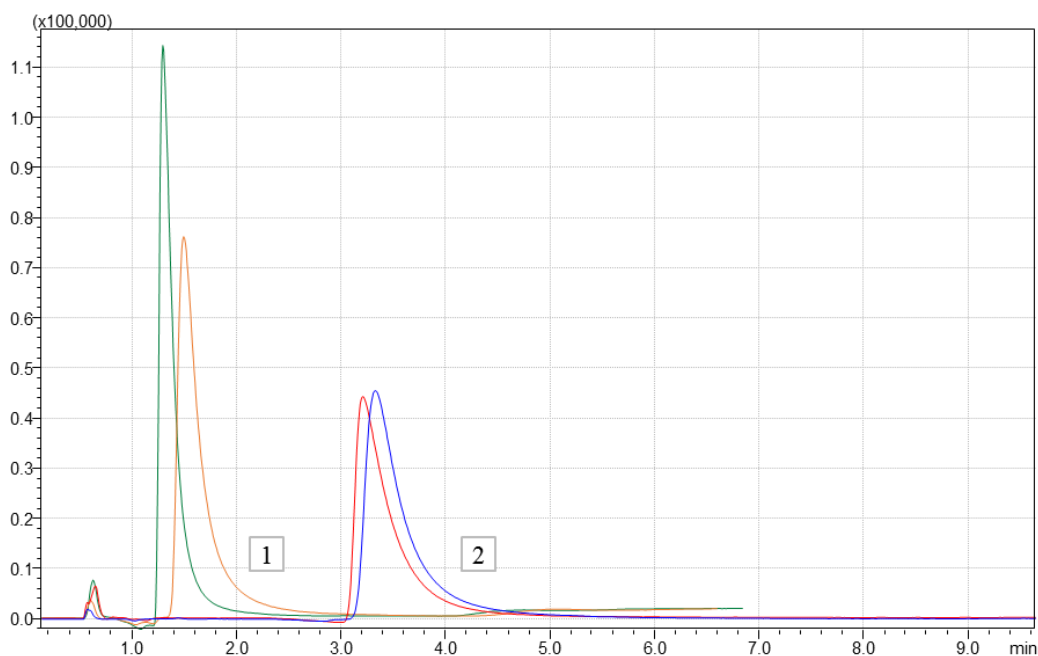
Přídavek MeOH do mobilní fáze opět způsobuje pokles retenčních časů zkoumaných analytů (obrázek č. 20) v porovnání s mobilní fází bez MeOH (obrázek č.19). Okyselení mobilní fáze bylo provedeno kyselinou chlorovodíkovou. Při snížení pH mobilní fáze s přídavkem MeOH dochází ke snížení retenčních časů o polovinu, než u mobilní fáze bez MeOH (obrázek č. 19). Při neupraveném pH mobilní fáze (2,5) lze pozorovat největší rozlišení (1,4) píků acikloviru a guaninu a vyšší retenci, ale tyto píky

mají neuspokojivou symetrii a vytváří se značné chvostování. Nižší pH (1,1 a 1,3) snížilo retenci než u mobilní fáze bez úpravy pH a také se výrazně zlepšila symetrie a tvar píků.

Na obrázku č. 21 je zobrazené porovnání retenčního chování acikloviru a guaninu mezi mobilní fází s methanolem a bez methanolu při pH = 1,1 obou mobilních fází.

Složení mobilní fáze:

- ACN : TFA – 85 : 15 (v/v); pH vodné fáze: 2,3
- ACN : MeOH : TFA – 60 : 25 : 15 (v/v); pH vodné fáze: 2,3
- pH mobilní fáze: 1,1
- molarita TFA: 0,5 mM
- teplota: 70 °C



Obrázek č. 21: Retenční chování acikloviru a guaninu při pH = 1,1 mobilní fáze. (1) 25 % MeOH, (2) bez MeOH; ACI – modrá, oranžová, GUA – červená, zelená.

Komentář:

Chromatogram znázorňuje porovnání mobilních fází při pH = 1,1 za 25 % přídavku methanolu a bez methanolu. Přídavek MeOH do mobilní fáze způsobil pokles retence obou analytů. Tvar a symetrie píků analytů jsou u pH 1,1 výrazně lepší než při neupravovaném pH (obrázek č. 19 a č. 20), ale rozlišení píků klesá (obrázek č. 21), proto nízké pH není vhodné pro další společnou analýzu acikloviru a guaninu.

5.7 Vliv změny poměru ACN a MeOH mobilní fázi

Porovnávání vlivu změn poměrů ACN a MeOH v mobilní fázi na retenci acikloviru a guaninu. Vodná fáze zůstala u všech měření stejná - 15 %.

Složení mobilní fáze:

- ACN : MeOH : TFA – 25 : 60 : 15 (v/v); pH: 2,9
- ACN : MeOH : TFA – 35 : 50 : 15 (v/v); pH: 2,8
- ACN : MeOH : TFA – 50 : 35 : 15 (v/v); pH: 2,8
- ACN : MeOH : TFA – 60 : 25 : 15 (v/v); pH: 1,9
- pH vodné fáze: 2,3
- molarita TFA: 0,5 mM
- teplota: 70 °C

zastoupení methanolu	retenční faktory	
	ACI	GUA
25 %	3,5	2,6
35 %	3,1	3,4
50 %	3,5	3,4
60 %	3,2	3,3

Tabulka č. 6: Vliv změny poměru methanolu na retenci acikloviru a guaninu.

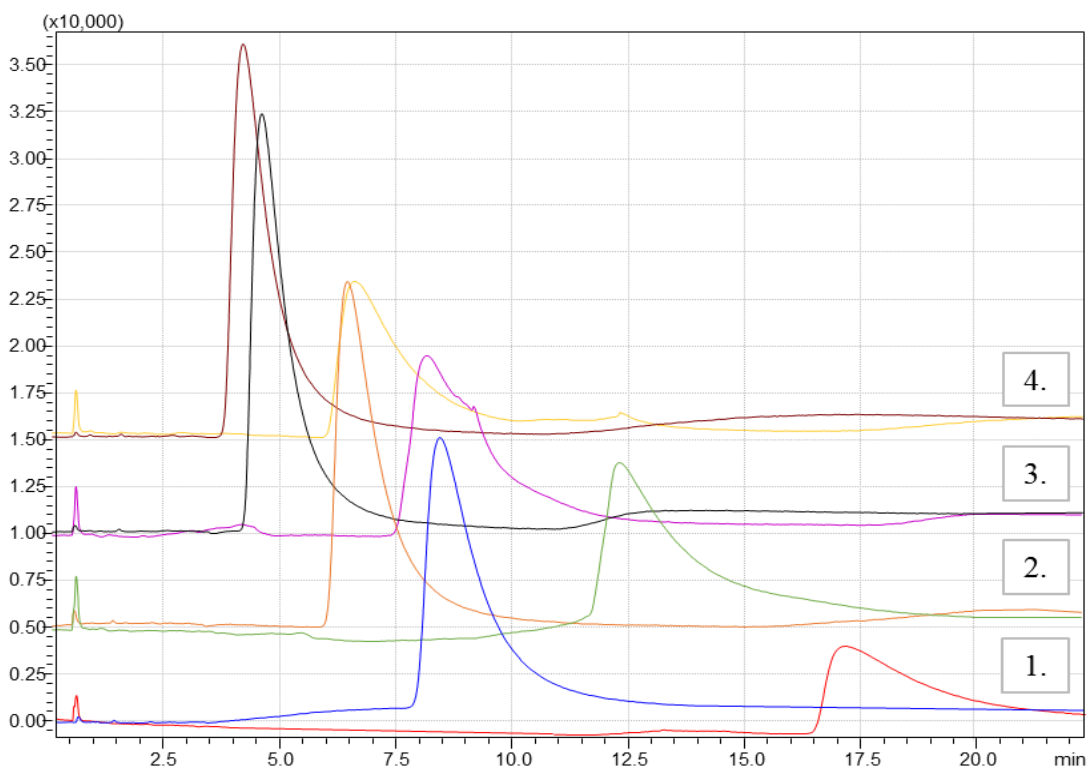
Komentář:

Z tabulky č. 6 lze vyvodit, že zvyšování zastoupení MeOH v mobilní fázi nemělo příznivý vliv na rozlišení píků acikloviru a guaninu. Retenční časy acikloviru a guaninu byly příliš blízko u sebe. Zastoupení methanolu větší než 25 % na úkor acetonitrilu je nevhodné pro společnou analýzu acikloviru a guaninu.

Dalším měření bylo vyzkoušeno, zda má menší poměr MeOH v mobilní fázi (5 % a 15 %) nějaký vliv na retenci analytů. Bylo provedeno měření s 0,1 mM TFA v mobilní fázi.

Složení mobilních fází:

1. ACN : TFA – 85 : 15 (v/v); pH: 2,6
 2. ACN : MeOH : TFA – 80 : 5 : 15 (v/v); pH: 2,6
 3. ACN : MeOH : TFA – 70 : 15 : 15 (v/v); pH: 2,7
 4. ACN : MeOH : TFA – 60 : 25 : 15 (v/v); pH: 3,0
- teplota: 70 °C; pH vodné fáze: molarita TFA: 0,1 mM



Obrázek č. 22: Retenční chování ACI a GUA v různém poměru ACI : MeOH mobilní fáze. ACI – modrá, oranžová, černá, hnědá; GUA – červená, zelená, fialová, žlutá. (1) ACN : TFA – 85 : 15, (2) ACN : MeOH : TFA – 80 : 5 : 15, (3) ACN : MeOH : TFA – 70 : 15 : 15, (4) ACN : MeOH : TFA – 60 : 25 : 15.

Komentář:

Pro další analýzu byla vybrána mobilní fáze 0,1 mM s přidavkem MeOH od 5 - 25 %. S přidavkem MeOH se retence obou sloučenin snižuje (obrázek č. 22). Také lze pozorovat snížení rozlišení mezi píky acikloviru a guaninu. S rostoucím zastoupením methanolu v mobilní fázi se jen nepatrně zlepšuje symetrie píků.

6. Závěr

V teoretické části se diplomová práce zabývá popisem acikloviru z pohledu fyzikálně-chemických vlastností a farmakologických vlastností, zahrnujících farmakokinetiku, mechanismus účinku, indikace a dostupné lékové přípravky na trh v České republice. Je také zmíněn guanin jako degradační produkt acikloviru. Druhý díl teoretické části tvoří úvod do vysokoúčinné kapalinové chromatografie, popis základních chromatografických systému, stacionárních fází a detektorů. Následně se zmiňuje o progresivní metodě HILIC - hydrofilní interakční chromatografii se spojením s chromatografickými kolonami na bázi oxidu zirkoničitého.

Experimentální část diplomové práce popisuje vlivy různých analytických podmínek na separaci acikloviru a guaninu. První popsany faktor byla teplota analýzy. Bylo sledováno, že zvyšující se teplota snižuje retenci acikloviru a guaninu.

Dalším pozorovaným faktorem, který má významný vliv na retenci, je přítomnost octanu amonného nebo trifluoroctové kyseliny různých molarit v mobilní fázi. Přítomnost octanu amonného jako Lewisovy baze vytváří soutěž pro výměnu ligandů o Lewisovy kyseliny na povrchu zirkoniové kolony. Čím je koncentrace octanu amonného vyšší, tím jsou více obsazena vazebná místa a tím klesá retence analytů.

Následně jsou popsány různé poměry organické a vodné složky v mobilní fázi, byla zkoušena i mobilní fáze s různým přídatkem methanolu. Vysoký obsah ACN (81 – 95 %) způsobuje, že mobilní fáze je více hydrofobní, zkoušené analyty preferují hydrofilnější část mobilní fáze, která je u povrchu zirkoniové kolony. Tento jev vede ke zvýšení retence acikloviru a guaninu.

Přídavek methanolu do mobilní fáze vede celkově ke snížení retence obou analytů oproti mobilní fáze bez methanolu a zároveň se také zlepšuje symetrie píků ACI a GUA.

Byl také popsán vliv pH mobilní fáze na retenci acikloviru a guaninu. Nízké pH (1,3 a 1,1) má kladný vliv na symetrii a tvar píků analytů, ale rozlišení píků je velmi nízké.

Při eluci acikloviru a guaninu na Zr-C koloně při HILIC podmínkách pravděpodobně dochází ke komplexnímu mechanismu na principu výměny ligandů, hydrofobních a hydrofilních interakcí a do separace také zasahuje uhlíková vrstva stacionární fáze. Nejlepších výsledků při separaci analytů bylo dosaženo u mobilní fáze s poměrem ACN : MeOH : TFA (60 : 25 : 15) při molaritě TFA 5 mM.

7. Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Aktivace acikloviru	11
Obrázek č. 2: Mechanismus účinku acikloviru.....	12
Obrázek č. 3: Separace směsi dvou látek v chromatografickém systému	16
Obrázek č. 4: Schéma kapalinového chromatografu	17
Obrázek č. 5: Permeace molekul různé velikosti do pórů gelu	23
Obrázek č. 6: Princip HILIC metody chromatografie s zwitteriontovou stacionární fází	19
Obrázek č. 7: Ovlivnění selektivity v HILIC systému změnou mobilní fáze.....	20
Obrázek č. 8: Silanové skupiny na povrchu silikagelu.....	26
Obrázek č. 9: Hlavní druhy skupin přítomné na povrchu zirkoniové stacionární fáze ..	27
Obrázek č. 10: Schéma detektoru s diodovým polem	29
Obrázek č. 11: Obvyklé schéma hmotnostního spektrometru	31
Obrázek č. 12: Kvalitativní a kvantitativní hodnocení chromatografické separace	34
Obrázek č. 13: Schéma pro výpočet asymetrie píku.....	36
Obrázek č. 15: Retenční chování ACI a GUA při změnách teploty.....	45
Obrázek č. 14: Retenční chování acikloviru v závislosti na koncentraci octanu amonného v mobilní fázi při 70°C	46
Obrázek č. 16: Retenční chování ACI a GUA na různé pH mobilní fáze. ACI.....	47
Obrázek č. 17: Vliv změny poměru vodné fáze na retenci směsi acikloviru a guaninu. 51	
Obrázek č. 18: Retenční chování vzorku směsi acikloviru a guaninu v závislosti na změně vodné fáze.....	52
Obrázek č. 19: Retenční chování ACI a GUA při změně pH mobilní fáze.....	53
Obrázek č. 20: Retenční chování ACI a GUA při změně pH mobilní fáze za přídavku MeOH	54
Obrázek č. 21: Retenční chování acikloviru a guaninu při pH = 1,1 mobilní fáze.....	55
Obrázek č. 22: Retenční chování ACI a GUA v různém poměru ACI : MeOH mobilní fáze.....	57

8. Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Studie zabývající se analýzou při HILIC podmínkách	37
Tabulka č. 2: Složení mobilních fází s přidavkem methanolu.....	41
Tabulka č. 3: Retenční faktory acikloviru a guaninu při různých teplotách a molaritách $\text{CH}_3\text{COONH}_4$	44
Tabulka č. 4: Celkové pH mobilních fází a pH různých koncentrací trifluoroctové kyseliny v mobilní fázi (ACN : TFA - 85 : 15)	48
Tabulka č. 5: Celkové pH mobilních fází a pH různých koncentrací trifluoroctové kyseliny v mobilní fázi (ACN : MeOH : TFA – 60 : 25 : 15)	49
Tabulka č. 6: Vliv změny poměru methanolu na retenci acikloviru a guaninu	56

9. Seznam grafů

Graf č. 1: Retenční faktory acikloviru a guaninu v závislosti na měnící se molaritě TFA v mobilní fázi (ACN : TFA – 85 : 15)	48
Graf č. 2: Retenční faktory acikloviru a guaninu v závislosti na měnící se molaritě TFA v mobilní fázi (ACN : MeOH : TFA – 60 : 25 : 15).....	50

10. Seznam použitých zkratek

ACI	aciklovir
ACN	acetonitril
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
AUC	<i>area under curve</i> (plocha pod křivkou)
b-TiO ₂	<i>bare titania column</i> (nemodifikovaná chromatografická kolona na bázi oxidu titaničitého)
b-ZrO ₂	<i>bare zirconia column</i> (nemodifikovaná chromatografická kolona na bázi oxidu zirkoničitého)
CMV	cytomegalovirus
DAD	<i>diode-array detector</i> (detektor s diodovým polem)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (deoxyribonukleová kyselina)
EBV	virus Epstein-Barrové
EI	elektronová ionizace
ESI	ionizace elektrosprejem
EtOH	ethanol
GUA	guanin
HILIC	<i>Hydrophilic interaction chromatography</i> (hydrofilní interakční chromatografie)
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (vysokoučinná kapalinová chromatografie)
HSV-1	<i>Herpes simplex virus type 1</i> (herpetický vir typu 1)
HSV-2	<i>Herpes simplex virus type 2</i> (herpetický vir typu 2)
ICR	iontová cyklotronová rezonance
IEC	<i>Ion exchange chromatography</i> (iontově výměnná chromatografie)
IPA	isopropylalkohol
MeOH	methanol
M _r	relativní molekulová hmotnost
MS	<i>Mass spectrometry</i> (hmotnostní spektrometrie)
MS/MS	<i>Tandem mass spectrometry</i> (tandemová hmotnostní spektrometrie)

NP – HPLC	<i>Normal phase HPLC</i> (chromatografický systém na normálních fázích)
PBD	polybutadien
PDA	<i>photodiode-array detector</i> (detektor s fotodiodovým polem)
PS	polystyren
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (ribonukleová kyselina)
RP – HPLC	<i>Reverse phase HPLC</i> (chromatografický systém na reverzních fázích)
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i> (vylučovací chromatografie)
TOF	analyzátor doby letu
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i> (trifluoroctová kyselina)
UV-VIS	<i>Ultra-violet/visible</i> (ultrafialová a viditelná oblast světla)
VZV	virus varicella zoster
ZIC-HILIC	zwitteriontová kolona na silikagelovém nosiči
ZIC-pHILIC	zwitteriontová kolona na polymerním nosiči
Zr-C	zirkoniová kolona potažená elementárním uhlíkem
Zr-PBD	zirkoniová kolona potažená vrstvou polybutadienu
Zr-PS	zirkoniová kolona potažená vrstvou polystyrenu

11. Seznam použité literatury

1. *Český lékopis 2009*: Doplněk 2014. vyd. Praha: Grada Publishing a.s., 2014. ISBN 978-80-247-5193-1
2. O'NEIL M.J. (ed.), *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 2013, ISBN: 978-1-84973-670-1
3. LINCOVÁ D., FARGHALI H. a kolektiv., *Základní a aplikovaná farmakologie*, druhé, doplněné a přepracované vydání, Praha: Galén, 2007, ISBN 978-80-7262-373-0
4. LÜLLMANN H., MOHR K. a WEHLING M., *Farmakologie a toxikologie*, vydání 2., české, Praha: Grada Publishing a.s., 2004, ISBN 80-247-0836-1
5. LÜLLMANN H., MOHR K. a HEIN L., *Barevný atlas farmakologie*, vydání 4., české, Praha: Grada Publishing a.s., 2012, ISBN 978-80-247-3908-3
6. Státní ústav pro kontrolu léčiv, *Souhrn údajů o přípravku: ZOVIRAX 800MG, POR TBL NOB 35X800MG*, aktualizováno 12. 12. 2014, dostupné z URL: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0013705>
7. Parise Filho Roberto, Michelle Carneiro Polli, Silvio Barberato Filho, Monique Garcia, a Elizabeth Igne Ferreira. „Prodrugs available on the Brazilian pharmaceutical market and their corresponding bioactivation pathways". *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 46, č. 3 (září 2010): 393–420
8. Státní ústav pro kontrolu léčiv, *Souhrn údajů o přípravku: HERPESIN 400MG POR TBL NOB 25X400MG*, aktualizováno 15. 11. 2013, dostupné z URL: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0155936>
9. BRUNTON L., CHABNER B. a KNOLLMAN B., *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, vydání 12., McGraw Hill Professional, New York, 2011, ISBN 978-0-07-176939-6

10. Park N. H., Park J. B., Min B. M., a Cherrick H. M.. „Combined Synergistic Antiherpetic Effect of Acyclovir and Chlorhexidine in Vitro." *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology* 71, č. 2 (únor 1991): 193–96
11. Suzuki M., Okuda T. a Shiraki K., „Synergistic antiviral activity of acyclovir and vidarabine against herpes simplex virus types 1 and 2 and varicella-zoster virus", *Antiviral Research* 72, č. 2 (listopad 2006): 157–61
12. Fleischer R. a Johnson M., „Acyclovir Nephrotoxicity: A Case Report Highlighting the Importance of Prevention, Detection, and Treatment of Acyclovir-Induced Nephropathy", *Case Reports in Medicine* 2010 (2010)
13. Seedat A. a Winnett G., „Acyclovir-induced acute renal failure and the importance of an expanding waist line", *BMJ Case Reports* 2012 (12. červenec 2012)
14. Polso, A. K., J. L. Lassiter, a J. L. Nagel. „Impact of Hospital Guideline for Weight-Based Antimicrobial Dosing in Morbidly Obese Adults and Comprehensive Literature Review". *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 39, č. 6 (1. prosinec 2014)
15. Státní ústav pro kontrolu léčiv – SUKL, *Databáze léků*, [cit. 28. 1. 2016], dostupné z URL: <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>
16. KAZAKEVICH Y. a LOBRUTTO R., *HPLC for pharmaceutical scientists*. Hoboken, New Jersey: Wiley-Interscience, 2007, ISBN 04-716-8162-8
17. KLIMEŠ J. a kol., *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*, Hradec Králové: Nucleus, 2011, ISBN 978-80-87009-29-1
18. NOVÁKOVÁ L. a DOUŠA M., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*, 1. vyd, Praha: Lucie Nováková, 2013, ISBN 978-80-260-4243-3
19. KLOUDA P., *Moderní analytické metody*, 2. upravené a doplněné vydání, Ostrava: Pavel Klouda, 2003, ISBN 80-863-6907-2
20. BRAITHWAITE A. a SMITH F., *Chromatographic methods*, 5. vydání, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999, ISBN 07-514-0158-7

21. *Universität Bremen, Center for Environmental Research and Sustainable Technology, UFT - Bioorganische Chemie - Grundlagen der Chromatografie*, dostupné z URL: <http://chem.uft.uni-bremen.de/Chromatography/chrom065.htm>
22. MOLDOVEANU S. C. a DAVID V., *Essentials in modern HPLC separations*, 1.vydání, Waltham, Massachusetts: Elsevier, 2013, ISBN 978-0-12-385013-3
23. Alpert Andrew J. „Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds". *Journal of Chromatography A* 499 (19. leden 1990)
24. Buszewski Bogusław a Sylwia Noga, „Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) - a powerful separation technique", *Analytical And Bioanalytical Chemistry* 402, č. 1 (leden 2012)
25. Hemström Petrus a Knut Irgum, „Hydrophilic Interaction Chromatography", *Journal of Separation Science* 29, č. 12 (1. srpen 2006)
26. Guo Yong a Sheetal Gaiki, „Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography", *Journal of Chromatography A* 1074, č. 1–2 (13. květen 2005)
27. Olsen Bernard A, „Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities", *Journal of Chromatography A*, International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques. Part I, 913, č. 1–2 (13. duben 2001)
28. Li Ruiping a Junxiong Huang, „Chromatographic behavior of epirubicin and its analogues on high-purity silica in hydrophilic interaction chromatography", *Journal of Chromatography A* 1041, č. 1–2 (2. červenec 2004)
29. KNAUER „*How to perform HILIC method development?*" [cit. 24. březen 2016], dostupné z URL: <http://www.knauer.net/en/faq/detail/717-how-to-perform-hilic-method-development.html>.

30. Kalafut Peter, Radim Kučera a Jiří Klimeš, „The influence of a carbon layer deposited on a zirconia surface on the retention of polar analytes in an organic rich mobile phase", *Journal of Chromatography A*, Selected Papers from the 36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 1232 (6. duben 2012)
31. Nawrocki J., C. Dunlap, A. McCormick, a P. W. Carr, „Part I. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC", *Journal of Chromatography A* 1028, č. 1 (27. únor 2004)
32. Grumbach Eric S., Diane M. Diehl, a Uwe D. Neue, „The Application of Novel 1.7 μm Ethylene Bridged Hybrid Particles for Hydrophilic Interaction Chromatography", *Journal of Separation Science* 31, č. 9 (1. květen 2008)
33. Randon Jérôme Samuel Huguet, Claire Demesmay a Alain Berthod, „Zirconia based monoliths used in hydrophilic-interaction chromatography for original selectivity of xanthines", *Journal of Chromatography A* 1217, č. 9 (26. únor 2010)
34. ZirChrom Separations, Inc, „ ZirChrom®-EZ - The Next Generation Zirconia-Based RPLC Colum", *ZirChrom Newsletter vol. 4*, [cit. 25. března 2016], dostupné z URL: <https://www.zirchrom.com/newsletters/2003-03.asp>.
35. Kalafut P., R. Kučera, J. Klimeš a J. Sochor, „An innovative approach to the analysis of 3-[4-(2-methylpropyl)phenyl]propanoic acid as an impurity of ibuprofen on a carbon-coated zirconia stationary phase", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 49, č. 5 (12. červenec 2009)
36. MATYSOVÁ L., *Hmotnostní spektrometrie, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Praze: Studijní materiály Katedry analytické chemie, předmět Speciální metody instrumentální analýzy*, 2015, přednáška, dostupné z URL: <https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/KACH/?page=3&path=farmacie%5cspecialni+metody+instrumentalni+analzy%5cprednasky>
37. CVAČKA J., *Detekce ve vysokoučinné kapalinové chromatografii*, Praha, 2010, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, přednáška, dostupné z URL: <http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc3.pdf>.

38. Université Lille Nord de France, Université Lille I, *ATEM - CPG-SM - „Principe de fonctionnement“*, [cit. 26. března 2016] dostupné z URL: <http://atechimie.univ-lille1.fr/Techniques/CPG-SM/Principe-fonctionnement/>.
39. SNYDER Lloyd R, Introduction to modern liquid chromatography, 2. vydání, New York: John Wiley, 1979, ISBN 04-710-3822-9
40. ZirChrom Separations, Inc, „ *Traditional Reversed - Phase Method Development Guide*“, dostupné z URL: <https://www.zirchrom.com/CARB.asp>.
41. Kučera R., P. Kovaříková, M. Klivický, a J. Klimeš. „The retention behaviour of polar compounds on zirconia based stationary phases under hydrophilic interaction liquid chromatography conditions“, *Journal of Chromatography A* 1218, č. 39 (28. září 2011)
42. Zhou Ting a Charles A. Lucy, „Hydrophilic interaction chromatography of nucleotides and their pathway intermediates on titania“, *Journal of Chromatography A* 1187, č. 1–2 (11. duben 2008)
43. Zhou Ting a Charles A. Lucy, „Separation of carboxylates by hydrophilic interaction liquid chromatography on titania“, *Journal of Chromatography A* 1217, č. 1 (1. leden 2010)