

Abstrakt

Optimalizace chromatografických podmínek pro HPLC stanovení biologicky aktivních látek

Diplomová práce

Eva Kotíková

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové,

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Adenosintrifosfát (ATP), adenosindifosfát (ADP), adenosinmonofosfát (AMP), kreatin (C) a fosfokreatin (CP) jsou polární látky s velkým významem nejen v lidském organismu. V této práci se podařilo vyvinout HPLC/UV metodu, která umožňuje separaci všech těchto látek za izokratické eluce. Jako vhodná stacionární fáze byla vybrána zirkoniová kolona, jejíž hlavní předností oproti klasickým silikagelovým kolonám je stabilita v celé škále pH a při teplotách až do 200°C.

Nejlepší separace tak bylo dosaženo na koloně ZirChrom® - PHASE, s použitím dvousložkové mobilní fáze s průtokem 1 ml/min – složka A: 10mM hydrogenfosforečnanový pufr, pH 7 a složka B: 100% acetonitril. Detekce byla prováděna pomocí UV detektoru při vlnových délkách 254 nm pro ATP, ADP, AMP, cAMP a při 215 nm pro C a CP. Výsledné retenční časy při těchto podmínkách byly: cAMP = 2,1 min, C = 3,7 min, AMP = 4,7 min, CP = 6,4 min, ADP = 10,7 min, ATP = 27,9 min. Při analýze srdeční tkáně byl vzorek nejprve mechanicky homogenizován s 57 µl 100mM EDTA a následně přidán 0,5 ml 0,66M chlazené HClO₄. Po deproteinaci byl přidán 1 ml 0,66M K₂HPO₄ a vzorek centrifugován 5 min při 10000 otáčkách. Supernatant byl odebrán a 20 µl nastříknuto na kolonu. Pro zajištění dostatečné stability vzorku bylo nezbytné po celou dobu úpravy vzorku udržovat teplotu 4°C.